

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

KORRELATION VON BIOMETRIE UND GENOM VON MÄUSEEIZELLEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KATRIN PETERSEN
aus **Lüneburg**

Kiel **2010**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Siebert, Klinik für Strahlentherapie (Radioonkologie)

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel den 02.12.2010

Gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Gewidmet meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Wissenschaftsfelder	1
Reproduktionsmedizin	1
IVF	2
ICSI	3
Präimplantationsdiagnostik	5
Embryonenschutzgesetz	6
Polkörperanalyse	6
1.2 Embryologie und Genetik	7
1.3 Methoden	13
Biometrie	13
Chromosomenspreitung	13
FISH	14
FISH-Sonde	15
1.4 Zielsetzungen	15
Oogramm	16
1.5 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1.1 Untersuchungsgut	17
a) Mäuse	17
b) Medikamente	17
2.2 Material	18
a) Verbrauchsmaterial	18
b) Geräte	20

2.3	Methoden	21
2.3.1	Vorbereitung	21
2.3.2	Durchführung	23
	a) Morphologische Beurteilung	23
	b) Biometrische Ausmessung	28
	c) Fixierung	30
	d) Hybridisierung	32
2.3.3	Statistische Auswertung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Überblick	35
3.2	Versuchsaufbau	36
3.3	Mäuse	38
	a) Einfluss des Alters der Maus	39
	b) Eizellen	41
3.3	Effizienz	43
	a) Superovulation	43
	b) Hyaluronidase	44
	c) Fixierung	44
	d) FISH	46
3.4	Aneuploidien	48
	a) Darstellbarkeit von Aneuploidien	48
	b) Nondisjunction	52
	c) Balancierte Prädivision	52
	d) Unbalancierte Prädivision	52
3.5	Morphologie	52
	Eizellen ohne Polkörper	56
3.6	Biometrie	57
	a) Polkörper	59
	b) Perivitelliner Raum	60
	c) Zona Pellucida	62
	d) Zytoplasma	64
	e) Gesamtdurchmesser der Eizelle	66

3.7	Oogramm	67
3.8	Korrelation von Biometrie und Genom	69
3.9	Korrelation von normaler/nicht normaler Biometrie u. Genom	71
4.	Diskussion	73
4.1	Effizienz	74
4.2	Qualitative Morphologie	76
4.2.1	Morphologische Einteilung	76
4.2.2	Korrelation Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate	80
4.3	Biometrie	85
a)	Polkörper	85
b)	Perivitelliner Raum	86
c)	Zona Pellucida	86
d)	Zytoplasma	89
e)	Gesamtdurchmesser der Eizelle	90
4.4	Aneuploidien	92
4.5	Korrelation von Biometrie und Genom	93
4.6	Schlussfolgerung	94
5.	Literaturverzeichnis	95
6.	Abkürzungsverzeichnis	105
7.	Abbildungsverzeichnis	106
8.	Tabellenverzeichnis	107
9.	Diagrammverzeichnis	109
10.	Zusammenfassung	111
11.	Lebenslauf	114
12.	Danksagung	116

1. Einleitung

1.1 Wissenschaftsfelder

Reproduktionsmedizin

Die Reproduktionsmedizin beschäftigt sich mit den biologischen Grundlagen der menschlichen Fortpflanzung. Sie stellt einen wichtigen Bereich der Gynäkologie und Geburtshilfe dar und beschäftigt sich mit allen Bereichen und Problemen der Fortpflanzung. Einen entscheidenden Bereich stellt die Sterilitätsbehandlung dar. Als unfruchtbar definiert werden diejenigen Paare, bei denen es innerhalb eines Jahres trotz Schwangerschaftsprävention nicht zu einer Schwangerschaft kommt. In Deutschland sind ca. 15% der Paare ungewollt kinderlos. Die Ursachen dafür liegen zu 55% an einer eingeschränkten Fruchtbarkeit des Mannes. 17% begründen sich auf die Unfruchtbarkeit der Frau (3,6% durch Endometriose, 4,3% durch das PCO-Syndrom und 9,1% durch Eileiterschäden). In 24,3% der Fälle liegen ungeklärte Ursachen vor (Bahceci and Ulug, 2005).

Die Reproduktionsmedizin bietet durch assistierte Fertilisationsmethoden neue Hoffnung für ungewollt kinderlose Paare. Die 1992 eingeführte Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) stellt dabei das erfolgreichste Verfahren dar und verdrängt das Zona Drilling, die partielle Zona Dissektion (PZD) und die subzonale Spermieninjektion (SUZI). ICSI ist besonders erfolgreich bei männlicher Sterilität. Bei vorliegender Oligo-Asthenoteratozoospermie (OAT) verspricht die In Vitro Fertilisation (IVF) wenig Erfolg, denn die Spermatozoen sind nicht in der Lage, die Zona Pellucida zu überwinden. Diese dient der Oozyte während des natürlichen Befruchtungsvorganges als Schutz und Barriere und muß vom Spermium überwunden werden. Außerdem verhindert es das Eindringen weiterer Spermien nach erfolgter Befruchtung. Somit kann ICSI als mechanische Penetrationshilfe angesehen werden. Im Jahre 2005 lag die Schwangerschaftsrate nach IVF in Deutschland bei 30,42%, nach künstlicher Befruchtung mit Hilfe von ICSI bei 28,72% (Deutsches IVF-Register, 2006).

IVF

Bei der In vitro-Fertilisation (IVF) findet die Befruchtung außerhalb des Organismus statt (in vitro). Der Begriff „Retortenbaby“ beschreibt den Befruchtungsvorgang im Reagenzglas. Die Frau wird zunächst hormonell stimuliert, damit die reifen Eizellen anschließend transvaginal im Ovar punktiert werden können. In einem Nährmedium aus Serum und Spurenelementen werden Eizelle und Spermien im Petrischälchen zusammengebracht. Die Eizellen werden also außerhalb des Körpers befruchtet und im Brutschrank aufbewahrt, bis ein 2- bis 16-Zell-Stadium erreicht ist. Das Spermium überwindet selbstständig die Zona Pellucida und dringt in die Eizelle ein. In Deutschland dürfen nicht mehr als drei befruchtete Eizellen in den Uterus der Frau implantiert werden, die sich in der Gebärmutter Schleimhaut einnisten sollen. Das Embryonenschutzgesetz (EschG vom 13.12.1990) schränkt die Implantation beliebig vieler befruchteter Eizellen somit stark ein. IVF beinhaltet extrakorporale Befruchtung und Embryonentransfer.

Das erste Retortenbaby, das im Reagenzglas nach IVF geboren worden ist, wurde zum ersten Mal von dem Gynäkologen Patrick Steptoe und dem Physiologen Robert Edwards beschrieben (Steptoe and Edwards, 1978). Es kam 1978 in England zur Welt: Louise Brown. Seitdem sind weltweit knapp 2 Mio. Babys nach künstlicher Befruchtung zur Welt gekommen. In Deutschland wurde IVF zum ersten Mal 1981 erfolgreich durch Siegfried Trotnow in Erlangen durchgeführt. Der Junge wurde am 16.04.1982 in Erlangen geboren.

Mittlerweile ist fast jedes 80. Kind, das in Deutschland geboren wird, auf diese Weise „gezeugt“ worden. Das Deutsche IVF-Register hat seit Beginn der Datensammlung 1998 bis Mitte 2005 insgesamt mehr als 65.000 Geburten nach Kinderwunschbehandlung registriert (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2005).

Damit haben sich die assistierten Fertilisierungsmethoden längst abgesetzt von der allgemeinen Vorstellung experimenteller Untersuchungsmethoden, sondern haben sich als medizinische Behandlungsstrategie bei Kinderlosigkeit etabliert.

Die Erfolgsquote dieser Methode liegt jährlich bei ca. 30 % pro Versuch in Deutschland (DIR, Deutsches IVF-Register).

ICSI

Diese Befruchtungsmethode stellt eine Intrazytoplasmatische Spermieninjektion dar. Die erste erfolgreiche ICSI-Behandlung und damit das erste Herbeiführen einer Schwangerschaft nach direktem Einbringen einer Samenzelle in das Innere der Eizelle wurde 1992 von dem aus Italien stammenden Gianpiero D. Palermo und seiner Arbeitsgruppe in Brüssel durchgeführt (Palermo et al., 1992). ICSI hat sich seitdem weltweit als Behandlungsstrategie bei männlicher Sterilität durchgesetzt. Eizellen werden durch Punktion gewonnen. Die Eizellen sind von Kumuluszellen umgeben, die zuvor entfernt werden müssen, da sie andernfalls die Sicht und somit die Erfolgsrate vermindern (Abbildung 1).

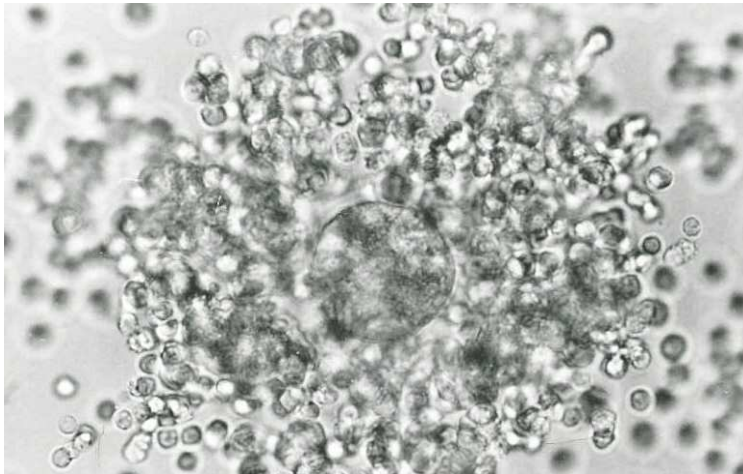


Abbildung 1: Eizelle mit Kumuluskomplex (eigenes Bild)

Die Abbildung 1 zeigt eine Eizelle mit den sie umgebenden Kumuluszellen, welche im weiteren Verlauf entfernt werden.

Unter mikroskopischer Kontrolle wird anschließend mit einer feinumigen Injektionsnadel jeweils ein einzelnes Spermium in die Eizelle eingebracht (Abbildung 2). Dadurch wird der Schritt umgangen, dass sich das Spermium den Weg durch die Eihülle bahnen muß. Nach zwei Tagen, im Stadium der Zellteilung, werden maximal drei der befruchteten Eizelle in den Uterus der Frau gebracht.

Diese Methode wird bei Oligozoospermie (< 10 Mio. Spermien/ml), Asthenozoospermie (herabgesetzte Beweglichkeit der Spermien) und Teratozoospermie (erhöhte Fehlformenrate der Spermien) angewandt. Auch hier findet sowohl eine extrakorporale Befruchtung als auch ein Embryonentransfer statt.

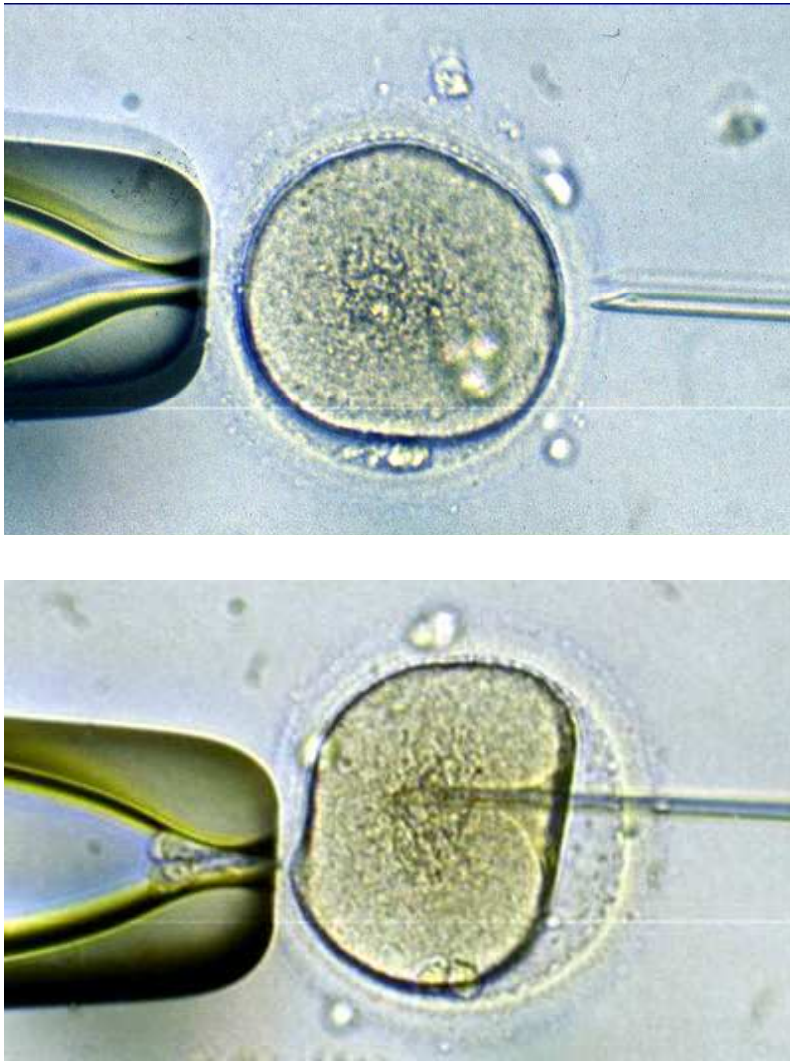


Abbildung 2: Mikroinjektion bei ICSI (Dr. A. Salmassi)

Auf diesen Bildern (Abb. 2) ist der Vorgang der Mikroinjektion bei ICSI dargestellt. Oberes Bild: Injektionsnadel penetriert Zona Pellucida. Unteres Bild: Injektionsnadel erreicht das Zytoplasma der Eizelle.

Die Einführung von ICSI in Deutschland erfolgte 1994 an der Universitäts-Frauenklinik Bonn durch Schmutzler et al. (1994). Die derzeitige Erfolgsquote liegt bei 30%.

Präimplantationsdiagnostik

Präimplantationsdiagnostik (PID, PGD, preimplantation genetic diagnosis) beschreibt die genetische Untersuchung künstlich befruchteter Eizellen, bevor sie in die Gebärmutter der Frau eingepflanzt werden. Es werden Zellen des sich entwickelnden menschlichen IVF-Embryos gewonnen und ihre DNA auf Abnormitäten untersucht. Im Anschluss kommt es zum Untergang der Zelle. Werden relevante Störungen gefunden, wird der Embryo nicht in den Uterus implantiert. Die Zellen werden im Rahmen einer Blastomerenbiopsie entnommen, also bis zum dritten Tag nach der Fertilisation. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Embryo im 4 – bis 10-Zell-Stadium. Während die Präimplantationsdiagnostik beispielsweise in England erlaubt ist, ist sie in Deutschland verboten. An dieser Stelle gewinnt die Polkörperdiagnostik an Bedeutung, denn sie erfolgt vor Abschluss der Befruchtung. Das erste Kind, welches nach PID geboren wurde und somit genetisch ausgewählt wurde, kam 1990 in England zur Welt (Handyside et al., 1992).

Eine weitere Methode stellt die Präkonzeptions- oder Präfertilisationsdiagnose dar. Sie ist eine der PID verwandten Methode und beinhaltet eine Genanalyse des Polkörpers (Polkörper-Biopsie). Diese Methode ermöglicht eine sehr frühe Aussage über Abnormitäten, ist allerdings beschränkt auf die Analyse von Oozyten-DNA.

Kommt es nach dem Embryonentransfer zu einer Schwangerschaft, so dient die Pränataldiagnostik (PND) der weiteren Diagnostik und Überprüfung des PID-Befundes. Abhängig von der angewandten Methode, ist durch PID eine Genanalyse bei Embryonen und unbefruchteten Eizellen bereits in vitro, post und prä fertilisationem möglich. Außerdem ist bei gegebener Diagnose eine Beendigung dieses reproduktiven Prozesses möglich, bevor die eigentliche Schwangerschaft beginnt.

Embryonenschutzgesetz

In Deutschland ist es gemäß Embryonenschutzgesetz (ESchG vom 13.12.1990) verboten, eine Präimplantationsdiagnostik zum Nachweis chromosomaler Anomalien an menschlichen Embryonen durchzuführen. Embryonen stellen dabei definitionsgemäß befruchtete und entwicklungsfähige Eizellen dar. Das Gesetz regelt den Missbrauch reproduktiver Maßnahmen, den Gebrauch menschlicher Embryonen und die Geschlechterwahl. Damit ist ebenso deren Selektion nicht möglich. Die Korrelation von Biometrie, Morphologie und Genom und die sich daraus ergebene Selektion könnte jedoch zu einer Verbesserung der Schwangerschaftsraten durch die zytogenetische Analyse des ersten Polkörpers führen.

Dieses Verfahren ermöglicht die Erkennung aneuploider Eizellen schon vor deren Befruchtung, die im weiteren Verlauf von einer Fertilisation ausgeschlossen werden könnten.

Unsere Untersuchungen wurden an Mäuseeizellen und nicht an menschlichen Eizellen durchgeführt, da das Embryonenschutzgesetz dieses und eine damit verbrauchende Embryonenforschung regelt.

Polkörperanalyse

Mit der Polkörperanalyse können Eizellen untersucht werden, bevor sie im Rahmen einer assistierten Fertilisation implantiert werden. Ziel ist es, dadurch eine höhere Schwangerschaftsrate zu erzielen. Der Polkörper wird nach erfolgter Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) entnommen und untersucht, jedoch vor Abschluss der Befruchtung. Diese Methode steht im Vergleich zur juristisch umstrittenen Präimplantationsdiagnostik, die erst nach erfolgter Befruchtung am Embryo durchgeführt wird. Die Polkörperanalyse ist laut Embryonenschutzgesetz zulässig.

Polkörper werden während der Reifeteilung von der Eizelle ausgestoßen. Sie beinhalten eine Kopie des Chromosomensatzes der Eizelle. Das Erbmateriale der Polkörper wird mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Im Gegensatz zur Blastomerenbiopsie, die in Deutschland verboten ist, wird die Menge der Embryonalzellen bei der Polkörperbiopsie (Abbildung 3 a-d) nicht reduziert. Die Polkörper sind sogenannte „Nebenprodukte“ der Entwicklung, die auf die embryonale Entwicklung keinen Einfluss haben.

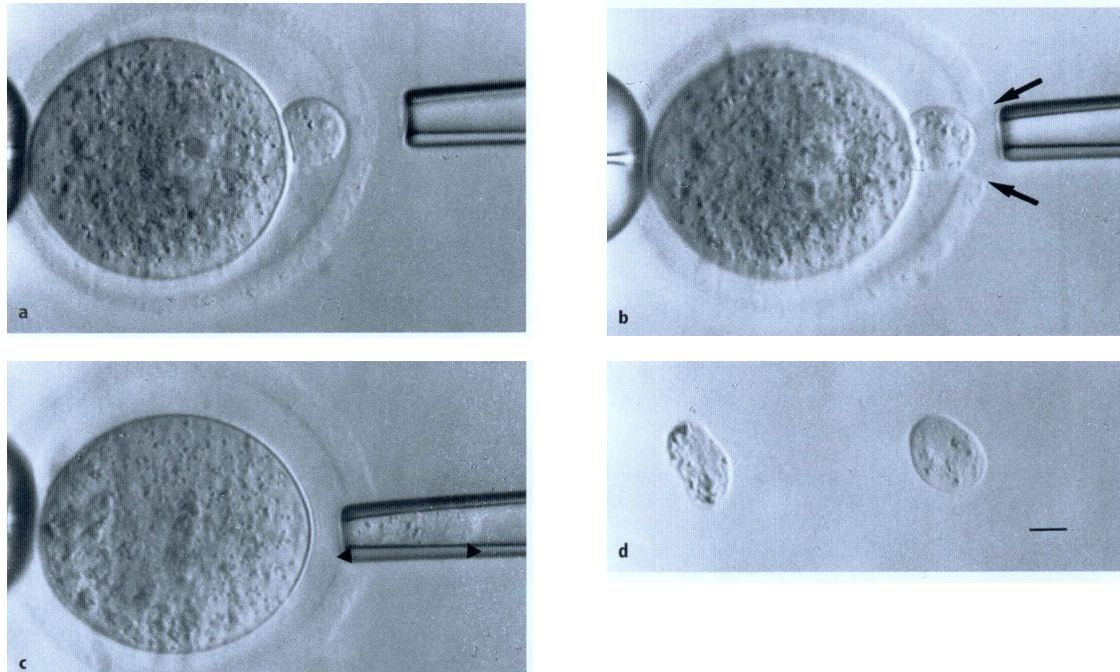


Abbildung 3 a-d: Polkörperbiopsie (Dr. A. Salmassi)

Dargestellt ist der Vorgang einer Polkörperbiopsie (a. Eizelle mit Polkörper (PK), Pipette zur Entfernung des PK am rechten Bildrand. b. Pipette an Zona Pellucida. c. Polkörper in Pipette. d. Biopsierte Polkörper.)

1.2 Embryologie und Genetik

Zum Zeitpunkt der Eizellgewinnung liegen die Eizellen im Stadium der Metaphase II (Metaphase der 2. Reifeteilung) vor. Sie befinden sich in der Meiose. In der Meiose finden im Gegensatz zur Mitose zwei Zellteilungen statt und es entstehen 4 Zellen. Die 23 doppelfädigen Chromosomen haben sich in der Äquatorebene angeordnet, am Zentromer aufgespalten und jede der neugebildeten Tochterzellen enthält 23 einzelne Chromosomen (Chromatiden). Es liegt somit ein haploider Chromosomensatz vor. Kurz vor der Ovulation ist die Oozyte erster Ordnung voll ausgereift und setzt die 1. Reifeteilung fort. In der 1. Reifeteilung kommt es durch Crossing Over zu einer zufälligen Durchmischung von väterlichem und mütterlichem Erbgut. Auch innerhalb chromosomaler Kopplungsgruppen

findet eine chromosomale Rekombination statt, sowie durch die zufällige Segregation maternalen und paternalen homologer Chromosomen.

Aus dieser Teilung gehen zwei Tochterzellen mit einem Chromosomensatz von jeweils 23 Chromosomen hervor, so dass am Ende der beiden Reifeteilungen aus einer weiblichen Keimzelle jeweils vier Tochterzellen entstehen. Es entwickelt sich nur eine der Tochterzellen zur reifen Eizelle.

Die Tochterzellen sind unterschiedlich groß und spielen unterschiedliche Rollen. Eine der Zellen stellt die Oozyte zweiter Ordnung dar und enthält das gesamte Zytoplasma. Die anderen Zellen sind deutlich kleiner und entwickeln sich zu Polkörpern, werden aus der Eizelle ausgeschleust und kommen zwischen Zellmembran und Zona Pellucida zu liegen. Der erste Polkörper wird mit Beginn der ersten Reifeteilung, unmittelbar vor dem Eisprung, von der Eizelle ausgeschleust und enthält den halben Chromosomensatz, damit nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle wieder 46 Chromosomen vorliegen. Der zweite Polkörper wird nach der Befruchtung ausgeschleust und die zweite Reifeteilung beginnt.

Während der menschlichen weiblichen Keimzellreifung endet die Meiose I im späten Prophasestadium. Reduktions- oder Reifeteilungen I finden bis zum Eintritt in die Pubertät statt, sie beginnen etwa ab dem siebten Fetalmonat. Mit Eintritt der Pubertät wird die Meiose I wieder aufgenommen. Beim Eisprung beendet die gesprungene Eizelle die 1. Reifeteilung. Zu diesem Zeitpunkt bildet die Eizelle ihren ersten Polkörper aus. Nun befindet sich die Oozyte in der Metaphase II. Kommt es zur Befruchtung, beendet die Eizelle die Metaphase II und gibt ihren zweiten Polkörper frei. Falls keine Befruchtung stattfindet, bildet sich der Gelbkörper (Corpus luteum) zurück und atrophiert (Corpus albicans).

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen jeweils eine Mäuseeizelle mit ausgebildetem Polkörper zum Zeitpunkt der Eizellgewinnung und nach Entfernung der sie umgebenden Kumuluszellen. Veranschaulicht werden soll daran der Aufbau der Eizelle mit Polkörper, Zytoplasma, Perivitellinem Raum und Zona Pellucida.



Abbildung 4: Eizelle mit Polkörper (eigenes Bild)

In Abbildung 4 sind Eizelle und ausgeschleuster Polkörper zu sehen. Der Polkörper ist oft als rundliches Gebilde in einem Spalt zwischen Eizelle und Eihülle sichtbar.

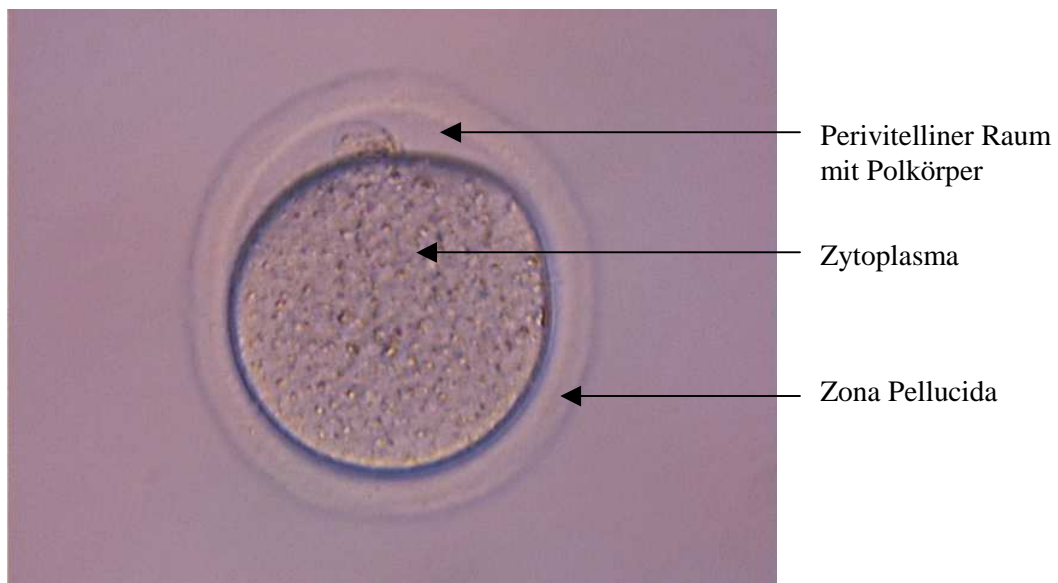


Abbildung 5: Eizelle der Maus (eigenes Bild)

Darstellung einer Eizelle mit Zona Pellucida, Perivitellinem Raum mit Polkörper sowie Zytoplasma (Abb.5).

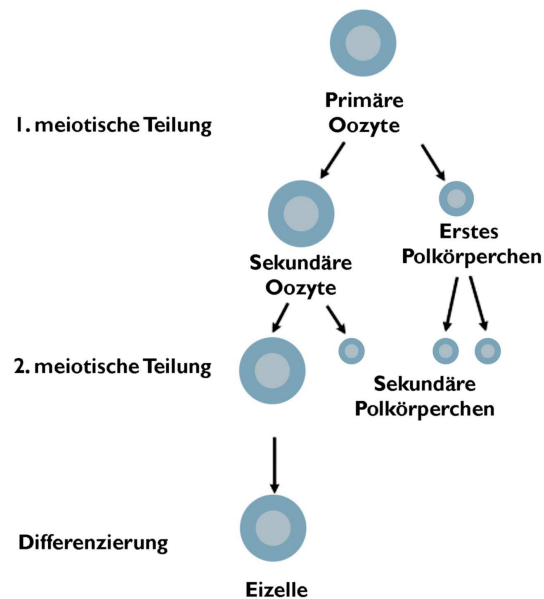


Abbildung 6: Entstehung des Polkörpers (eigene Darstellung)

Die Abbildung 6 beschreibt schematisch die Entwicklung des Polkörpers während der Meiose.

Somit enthalten Polkörper und Eizelle identische Chromosomen, nämlich jeweils 23 bivalente (doppelfädige) maternale Chromosomen. Kurz vor der Ovulation wird die erste Reifeteilung abgeschlossen.

Direkt im Anschluss folgt die 2. Reifeteilung (Abbildung 7). Sie wird nur dann beendet, wenn es zur Befruchtung der Oozyte kommt.

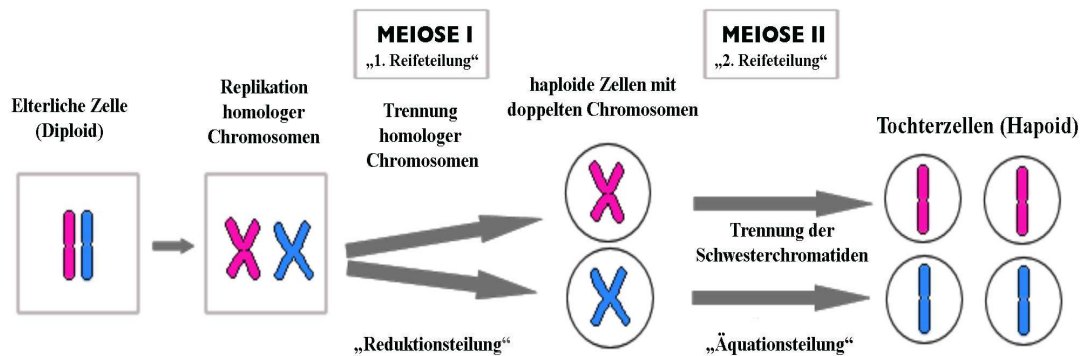


Abbildung 7: Meiose (eigene Darstellung)

Abbildung 7 veranschaulicht graphisch den Vorgang der Meiose. Meiose I (Erste Reifeteilung; Reduktionsteilung): Trennung homologer Chromosomen. Meiose II (Zweite Reifeteilung): Trennung von Schwesterchromatiden.

Es kommt schätzungsweise in bis zu 50% der Frühschwangerschaften zum Abort, der unbemerkt mit der nächsten Menstruation abgeht (Haag et al. 2003). Die häufigste Ursache stellen fehlgebildete Zygoten dar, wovon 50% auf Chromosomenstörungen (Aneuploidien) zurückzuführen sind. Die Störungen im Chromosomenmuster entstehen während der Reifeteilungen.

Eine **Non Disjunction (NDJ)** kommt dadurch zustande, dass sich die beiden Chromatiden eines homologen Chromosomenpaares während der 1. Reifeteilung nicht trennen, sich also beide in einer Zelle befinden. Damit erhält eine Zelle 24 Chromosomen (NDJ+), während die andere statt 23 nur 22 Chromosomen erhält (NDJ-). Daraus entsteht nach Befruchtung entweder eine Trisomie (47 Chromosomen) oder Monosomie (45 Chromosomen). NDJ kann sowohl in der 1., als auch in der 2. Reifeteilung auftreten, in der Regel jedoch ausschließlich bei der Eizellreifung, und nur selten in der Spermiogenese.

Balancierte Translokationen entstehen nach Chromosomenbrüchen, bei denen sich Chromosomenteile an andere Chromosomen anlagern. Balanciert sind sie dann, wenn keine wesentlichen Abschnitte des genetischen Materials verloren gehen oder zusätzlich vorhanden sind. Fehlbildungen treten hier nicht auf.

Nicht balancierte Translokationen können aus Chromosomenbrüchen jedoch auch resultieren. In diesem Fall fehlt entweder ein Stück des Chromosoms oder es liegt zusätzliches Material vor. Ein veränderter Phänotyp entsteht. Beim Down-Syndrom (Translokations-Trisomie 21) ist die Translokation prinzipiell balanciert, die Trisomie kommt jedoch durch die Anlagerung eines zusätzlichen Chromosomenstückes des Chromosom 21 an ein anderes Chromosom zustande (Verteilungsfehler). Somit wird die Translokation unbalanciert.

Prädivision. Diese Form der Chromosomenfehlverteilung kommt durch eine vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden zustande. Unterschieden werden eine balancierte und eine unbalancierten Prädivision:

- **Balancierte Prädivision (bp):** Je zwei nicht mehr verbundene Chromatiden eines Chromosoms sind nachweisbar.
- **Unbalancierte Prädivision (ubpd):** Unbalanciert ist der Zustand dann, wenn nach einer Zellteilung die bereits während der Zellteilung einzelnen Chromatiden derart auf die Tochterzellenverteilt werden, dass sich nach der 1. meiotischen Teilung nicht zwei Schwesterchromatiden und nach der 2. meiotischen Teilung nicht eine Schwesterchromatide in einer Zelle befindet.

1.3 Methoden

Um die Implantationsrate und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit nach assistierter Fertilisation zu verbessern und eventuelle Vorhersagen über den Erfolg einer künstlichen Befruchtung machen zu können, wurde nach einer Methode gesucht, die eine Auswahl der zu implantierenden Eizellen ermöglicht. Mit Einführung der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) war es möglich, unbefruchtete Eizellen genauer morphologisch zu beurteilen, da das Spermium unter mikroskopischer Kontrolle in die Eizelle eingebracht wird. Es ist gelungen, die Eizellen so zu behandeln, dass sich einzelne oder alle Chromosomen darstellen und bewerten lassen.

Biometrie

Mit der biometrischen Bestimmung werden Eizellen gemessen und ausgewertet. Die Biometrie stellt eine Methode zur Beschreibung von Eizellen dar.

Chromosomenspreitung

Eine optimale Chromosomenausbreitung ist Voraussetzung für eine adäquate Chromosomenanalyse. Die ursprüngliche Fixierungstechnik zur Präparation von Chromosomen wurde 1966 entwickelt (Tarkowski, 1966), bei der das Zytoplasma der Oocyte bei der Präparierung eröffnet wurde. Dieses Verfahren stellte sich aber als nicht optimal heraus, da es häufig zur Zerspaltung von Eizellen und somit zum möglichen Verlust von Chromosomen oder Chromatiden kam.

Kamiguchi et al. entwickelten 1976 schonendere Fixierungsmethoden, in dem sie das ursprüngliche Verfahren modifizierten. Die neue Methode stellte ein graduelles Fixierungsverfahren dar, bei dem die Eizellen mit drei verschiedene Fixierungslösungen behandelt werden. Ziel ist es, die Zytoplasmagrenzen der Eizellen zu erhalten und damit Artefakte zu vermeiden.

FISH

Die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) dient der Sichtbarmachung von DNA-Abschnitten durch homologe DNA-Sonden, die mit Fluorochromen markiert sind. Benutzt werden fluoreszierende Moleküle zur Darstellung von Genen oder Chromosomen und zur Identifizierung chromosomaler Abnormitäten. Es werden kurze Sequenzen einsträngiger DNA präpariert, welche die FISH-Sonden darstellen. Diese Sonden sind komplementär zu den DNA-Sequenzen, die angefärbt und untersucht werden sollen. Sie binden und hybridisieren den komplementären DNA-Strang. Durch ihre Ausstattung mit Fluoreszenzmolekülen können bestimmte Orte auf der DNA-Sequenz sichtbar gemacht werden. Die FISH-Analyse lässt es zu, Nukleinsäuresequenzen sowohl in Zellen, Zellkernen, Geweben, als auch in Chromosomen darstellbar zu machen (Abbildung 8).

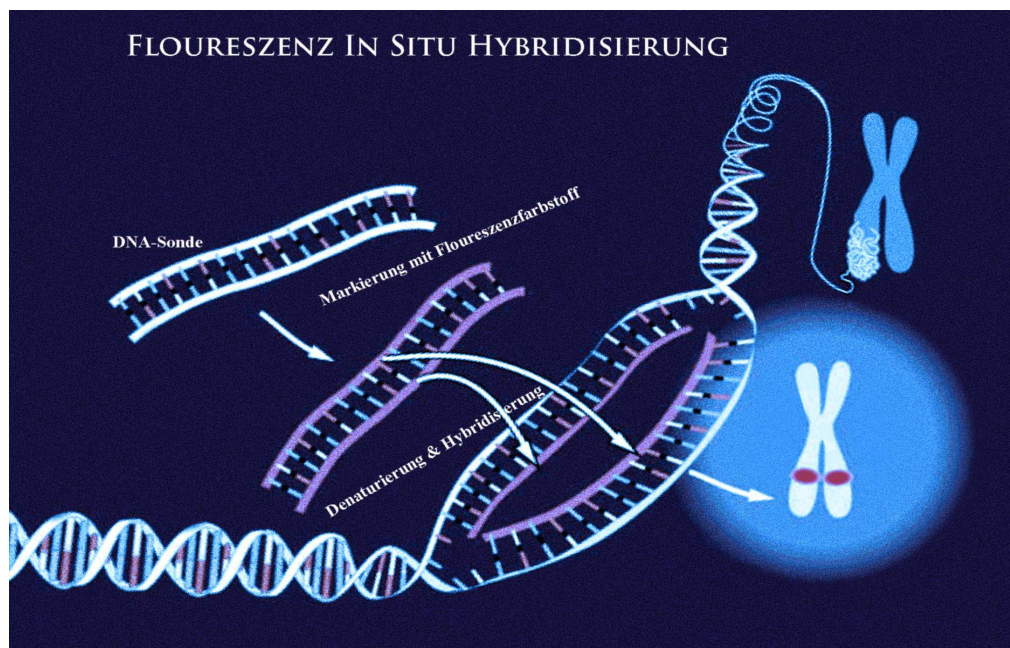


Abbildung 8: Der FISH-Mechanismus (eigene Darstellung)

In dieser Abbildung (Abb. 8) ist der Hybridisierungsvorgang graphisch dargestellt: DNA-Sonde bindet an komplementären DNA-Strang.

Die Ziel-DNA muß als Einzelstrang vorliegen. Aus diesem Grund wird sie zunächst denaturiert, ihre ursprüngliche Form wird verändert.

Die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung wurde erstmals von Pardue und Gall (1969), sowie von John et al. (1969) unabhängig voneinander beschrieben.

FISH-Sonde

Whole chromosome – Sonde

Sie sind im eigentlichen Sinne Sammlungen kleinerer Sonden. Jede einzelne Sonde hybridisiert eine unterschiedliche Sequenz auf einem einzelnen Chromosom. Auf diese Weise kann ein ganzes Chromosom dargestellt werden (full-color map). Diese Sonden sind speziell dafür geeignet, chromosomale Abnormitäten anzuzeigen, beispielsweise die Verknüpfung zweier Chromosomen miteinander.

1.4 Zielsetzungen

In dieser Arbeit soll die Biometrie der Eizellen untersucht werden. Dazu wurden Mäuseeizellen aus superovulierten Mäusen verwendet, die sich in der Metaphase II befanden und einen sichtbaren Polkörper ausgestoßen hatten.

Dahinter steckt die Überlegung, dass ein Zusammenhang zwischen biometrischen Merkmalen des ersten Polkörpers, des Perivitellinen Raumes, der Zona Pellucida, des Zytoplasmas, der Gesamteizelle und dem Genom der Eizelle bestehen könnte.

Mit Hilfe dieser Daten soll herausgearbeitet werden, ob eine Vorauswahl von Eizellen anhand biometrischer Kriterien möglich ist, um so die Schwangerschaftsrate im Rahmen assistierter Fertilisation beim Menschen zu steigern. Optimalerweise sollen Rückschlüsse von der reinen Betrachtung der Eizelle auf ihren genetischen Zustand gezogen und damit eine nicht invasive Methode zur Vorauswahl von Eizellen geschaffen werden.

Gemäß eines Spermatogrammes soll anhand unserer Daten der Versuch unternommen werden, ein „Oogramm“ zu erstellen, indem „normale“ Biometrie von „nicht normaler“ unterschieden wird (Definition „normal“: mittlere Zweidrittel eines jeden Eizellpools).

Oogramm

Analog zum Spermogramm soll mit dieser Arbeit die Möglichkeit geschaffen werden, „normale“ Eizellen zu beschreiben und zu definieren.

Für Spermatozoen existieren genaue morphologische Angaben, welche das „normal geformte“ Spermium charakterisieren. Entscheidender Parameter für die Fertilitätsprognose ist der Anteil normal geformter Spermatozoen.

1.5 Fragestellung

Es ergeben sich folgende Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

1. Besteht eine Korrelation zwischen Biometrie und Genom in Eizellen der Maus?
2. Stellt die Biometrie einen Selektionsmarker dar?
3. Lassen sich Morphologie und Biometrie voneinander abgrenzen?

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

a) Mäuse

Als weibliche Spendertiere diente der Stamm B6 D2 F1 (Jackson-Laboratorien, JAX[®] Mice, vgl. Talansky 1988, Gordon 1986 a, b). Die hybridisierten Mäuse sind genetisch und phänotypisch uniform, zeichnen sich durch ihr schwarzes Fell aus und sind gut geeignet für die In vitro-Fertilisierung. Die Weibchen wurden in einem Alter von 8 Wochen bestellt und verbrachten anschließend bis zu weiteren 8 Wochen im Tierstall. Die Mäuse hatten zum Zeitpunkt der Superovulation und Eizellgewinnung ein durchschnittliches Alter von 13 Wochen. Es wurden pro Woche 6 Mäuseweibchen bestellt, so dass jeweils 2 Mäuse pro Versuchstag zur Verfügung standen. Eine erfolgreiche Superovulation mit hoher Eizellausbeute hängt entscheidend von der gewählten Mauslinie ab. Erfahrungsgemäß sind Hybride sehr gute Superovulierer.

Das Embryonenschutzgesetz verbietet die verbrauchende Forschung an Embryonen. Aus diesen Gründen finden unsere Untersuchungen an Eizellen der Maus und nicht an menschlichen Eizellen statt.

Die Tierversuche waren rechtlich genehmigt.

b) Medikamente

PMSG (Gonadotropin, **p**regnant **m**are`s **s**erum **g**onadotrophin) ist ein saures Glykoprotein mit einem hohen Molekulargewicht (70.000 Dalton) und einem hohen Kohlenhydratanteil (45%). PMSG wird aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen (Grunert 1995) und wird während der frühen Trächtigkeit (40. bis 140. Tag) von fetalen trophoblastischen Zellen gebildet. Peroral ist das Hormon wirkungslos, da das Eiweiß im Magen-Darm-Trakt enzymatisch verdaut wird. PMSG kann intravenös, intramuskulär, subkutan und intraperitoneal appliziert werden.

PMSG ist Bestandteil der Superovulation und dient dazu, die weiblichen Spendertiere in den Ovarialzyklus zu bringen und möglichst viele Eizellen im Eileiter zu erhalten. Durch die Superovulation kann man sowohl bei pubertären Tiere den ersten Zyklus induzieren, als auch ältere Tiere synchronisieren.

HCG (**h**uman **c**horionic **g**onadotropine) ist ein Proteohormon mit einem Molekulargewicht von 39.000 Dalton. Es dient dazu, den Eisprung zu induzieren und auszulösen.

2.2 Material

a) Verbrauchsmaterial

Injektionen

Zur intraperitonealen Injektion von PMSG und HCG wurden sterile Heparinspritzen und sterile Einmalkanülen der Größe 0,5 ×16 mm (BD Microlance™ 3) eingesetzt. Bei der Wahl der Kanüle war darauf zu achten, dass die Nadel eine so geringe Länge hatte, dass keine inneren Organe der Maus damit beschädigt werden konnten.

Chirurgie

Zur Eröffnung des Bauchraumes, anschließender Explantation der Eileiter und Ovarien und dem Transport der Adnexe wurden folgende Instrumente benutzt: Chirurgische Schere und chirurgische Pinzette für die Öffnung des Felles, zwei Uhrmacherpinzetten und eine gerade Irisschere (10,5 cm) zur Eröffnung des Peritoneums, zur Darstellung von Uterus und Adnexen, zur intraabdominellen Präparation von Eileiter und Ovar und anschließendem Einbringen in die Transportlösung.

Präparation

Zur Präparation der Eizellen wurden die folgenden Materialien benötigt: Sterile isotonische NaCl-Lösung (0,9%, Berlin Chemie) zum Transport der Adnexe nach der operativen Gewinnung, Pasteurpipetten, Gummischlauch und Mundstück zum Transport und zur mechanischen Präparation der Eizellen, sterile Falcon-Petri-Schalen mit einem Durchmesser von 55 mm (Sarstedt, Nr. 1006) zur Inkubation der Eizell-Kumuluskomplexe in Hyaluronidase und zur weiteren Aufbewahrung, Kanülen (gelb) zur Eröffnung der Tuben und Herauslösen des Kumulus-Eizell-Komplexes. IVF-Universalmedium zur Aufbewahrung, Präparation und Kultivierung der Eizellen (Fa. Mediacult, Stefan Gück Zellkulturbedarf GmbH, Berlin), Hyaluronidase zur Trennung der Eizellen vom Kumuluszellverband (Fa. Linaris, 80 IU pro ml). Zur Aufbewahrung der präparierten Eizellen wurden die in Mediumtropfen gelagerten Eizellen von leichtem weißen Mineralöl überschichtet (Fa. Sigma, M 8410, embryokulturgetestet). Dadurch wurde verhindert, dass es zu einem Konzentrationsanstieg durch Verdunstung kommt.

Fixierung

Für die Eizellfixierung wurden folgende Instrumente und Materialien benutzt: Pasteurpipetten unterschiedlicher Dicke sowie Gummischlauch und Mundstück zum Umsetzen der Eizelle in die Fixierungslösungen, Fixierungslösung A und B (Tabelle 1), Sodiumcitratlösung (Tabelle 1) zur Vorbehandlung der Zellen, Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel Gläser Braunschweig, 75×25×1mm), auf denen die Eizellen fixiert wurden, Diamantstift zur Markierung des Objektträgers, serologische Pipetten und sterile Einmalaufsätze.

Lösung	Zusammensetzung	Temperatur	Inkubationszeit
hypotone Lösung	0,9% Sodiumcitrat	Raumtemperatur	6 Minuten
Fixierung A	Methanol:Eisessig = 1:1	Raumtemperatur	5 Sekunden
Fixierung B	Methanol:Eisessig = 3:1	Raumtemperatur	3 Sekunden
Fixierung B	Methanol:Eisessig = 3:1	Raumtemperatur	5 Minuten

Tabelle 1: Fixierungslösungen und Sodiumcitrat

In Tabelle 1 sind die verschiedenen Fixierungslösungen mit ihrer Zusammensetzung sowie notwendiger Inkubationszeit wiedergegeben.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden folgende Materialien verwendet: Denaturierungspufferlösung, 70% Formamide/2×SSC, Alkoholreihe (70%, 90% und 100%), DNA-Sonde (Total Mouse Chromosome DNA Probe, Chromosome 16, Direct labelled-red; Q•BIOgene molecular cytogenetics), Eisblock zur Kühlung der denaturierten Sonde, Deckgläser (8×8mm), Klebstoff (FixoGum Rubber Cement, Marabu) zum Versiegeln der Deckgläser auf den Objektträgern, 0,5×SSC als Waschmedium, Waschmedien A und B, SSCT, DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) zum Anfärben von DNA, Antifade-Lösung (p-Phenylenediamine) zum Schutz der Färbung vor dem Ausbleichen, Kühlschrank (4 °C, Liebherr) zur Aufbewahrung der Objektträger bis zur Weiterverarbeitung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Chromosom 16 der Maus untersucht, da es in weiten Strecken dem menschlichen Chromosom 21 entspricht. Zentromersonden vom Chromosom 16 der Maus und lokusspezifische Sonden für das Chromosom standen nicht zur Verfügung.

b) Geräte

Präparation

Zur Eizellpräparation wurden folgende Geräte benutzt: Bunsenbrenner zum Ausziehen der Pasteurpipetten, Brutschrank (Heraeus, 5% CO₂-Begasung, Temperatur 37°C, Luftfeuchtigkeit 95-100%) zur Lagerung der Eizellen bis zur Weiterverarbeitung, Stereomikroskop von Zeiss (stufenlose bis 70-fache Vergrößerung) für die Eizell-Präparation unter Sicht, Invertmikroskop von Olympus (100 bis 400-fache Vergrößerung) zur morphologischen Beurteilung der Zellen nach Ablösung der Kumuluszellen, digitale Bildverarbeitung (Kamera und Computerprogramm) von Olympus (OCTAX Eye Ware Laser Shot Mikroskop, 100 bis 400-fache Vergrößerung) zur Erfassung biometrischer Daten der Eizellen, adaptierbare Spiegelreflexkamera (Nikon).

Fixierung

Für die Eizellfixierung wurden folgende Geräte verwendet: Stereomikroskop zur Umsetzung der Eizellen und zur Verlaufskontrolle während der Fixierung, Feuchtkammer und Brutschrank zur Inkubation der Objektträger, Koordinatenmikroskop (Zeiss, 1000-fache Vergrößerung) zur genauen Bestimmung der Chromosomen auf dem Objektträger, Gefrierfach (-75°C) zur Aufbewahrung der Objektträger.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden die folgenden Geräte benötigt: Zentrifuge (Hettich, Universal 16R) zur Denaturierung, Feuchtkammer und Heizplatte (Medax, 36°C) zur Inkubation, Wasserbad (Haake, DC3) zur Denaturierung der Chromosomen, Fluoreszenzmikroskop zur Chromosomenbeurteilung, CCD-Kamera.

2.3 Methoden

2.3.1 Vorbereitung

Herstellung der Glaspipetten

Glaspipetten stellten ein wichtiges Utensil bei der Präparation und Weiterverarbeitung der Eizellen dar. Verwendet wurden Pasteurpipetten der Firma Sarstedt. Diese wurden über der Bunsenbrennerflamme ausgezogen, um das Lumen zu verkleinern und dem jeweiligen Arbeitsschritt anzupassen. Es wurde unter dem Stereomikroskop kontrolliert, dass die Pipettenspitze keine scharfen und spitzen Kanten aufwies, um die Eizelle nicht zu beschädigen. Außerdem mußte der innere Durchmesser so groß sein, dass eine mechanische Ablösung von verbliebenen Kumuluszellen möglich war, er durfte jedoch nicht zu klein sein, damit ein Steckenbleiben der Eizelle oder deren Beschädigung vermieden wurde.

Vorbereitung der Mäuse

Adaptation

Bevor mit der Superovulation der Mäuseweibchen begonnen werden konnte, wurden sie einige Tage an die neue Umgebung adaptiert, um sich von der Strapaze des Transportes zu akklimatisieren. Es befanden sich maximal 6 Mäuse in einem Käfig. Die Käfige wurden im gleichmäßig klimatisierten Tierstall aufgestellt, waren vom Außenlicht abgeschirmt und einem künstlich erzeugten Tag-Nacht-Rhythmus unterstellt mit einer Lichtphase von 8-20 Uhr. Die Käfige waren mit Streu, Zellstoff und Pappröhren ausgestattet. Haferflocken, Pellet-Trockenfutter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung.

PMSG

PMSG (Pregnant Mare`s Serum Gonadotrophin) wurde am dritten Tag vor der geplanten Eizellgewinnung intraperitoneal injiziert, mit einer Dosierung von 10 IU (International Units) in 200 µl NaCl 0,9%. Durch die PMSG-Gabe wurde die Superovulation induziert. Es reiften ausreichend viele Eizellen heran, ohne dass es jedoch zu einer Beeinträchtigung des Kreislaufs der Maus durch zu große Mengen PMSG kam.

HCG

HCG (human chorionic Gonadotropine) wurde 48 Stunden nach der PMSG-Gabe intraperitoneal injiziert (10 IU in 200 µl NaCl) und löste bei den superovulierten Mäuseweibchen den Eisprung aus.

Tubarektomie und Eizellgewinnung

Das Spenderweibchen wurde 14 Stunden nach HCG-Gabe durch Genickbruch geopfert. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Eisprung des superovulierten Weibchens stattgefunden und es befand sich eine ausreichende Anzahl an Eizellen in den Tuben der Maus.

Zunächst wurde das Fell der Maus an der Bauchseite mit 70%-igem Alkohol angefeuchtet und desinfiziert. Es wurde dann mit der chirurgischen Schere ein kleiner Schnitt gesetzt, um anschließend das Fell mit beiden Händen jeweils nach kranial und kaudal auseinander zu ziehen. Daraufhin wurde das Peritoneum mit einer Irisschere halbbogenförmig aufgeschnitten. Nun wurden die Darmschlingen nach kranial geschlagen, um eine bessere Darstellbarkeit von Uterus und Adnexen zu erzielen. Durch vorsichtigen Zug mit einer spitzen Pinzette am jeweiligen Uterushorn kamen die dazugehörige Tube und das Ovar besser zur Darstellung. Nach Präparation des distalen Uterushornes, der Tube und des Ovars wurden rechte und linke Tube getrennt voneinander durch Absetzen des distalen Uterushornes und proximalen Ovars explantiert. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung in 0,9%-iger steriler NaCl-Lösung aufbewahrt.

Bei zwei Mäusen pro Versuchstag wurden je vier Tuben in eine Petrischale mit Kulturmedium gegeben. Nacheinander wurden die Eileiter unter mikroskopischer Sicht mit einer Kanülenspitze an der Ampulla tubae uterinae der Länge nach inzidiert. Ohne Notwendigkeit der weiteren Manipulation quollen die in Kumulusmassen eingebetteten Eizellen spontan hervor. Ein geringer Anteil der Kumuluszellen (5%) löste sich von alleine vom Komplex ab, der größte Teil der Kumuluszellen blieb fest an den Eizellen haften, es bildeten sich jedoch kleinere Eizell-Kumulus-Verbände von etwa 8 Eizellen. Diese wurden gruppenweise in eine Petrischale mit jeweils frischer, auf 37°C vorgewärmter Hyaluronidase gebracht und für 7,5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation hatten die Eizellen einen Grossteil ihrer Kumuluszellen verloren (ca. 97%).

Die Eizellen wurden anschließend aus der Hyaluronidase in eine Petrischale mit Nährmedium umgesetzt und durch mehrmaliges Ansaugen mit dem Medium in die Glaspipette mechanisch von den restlichen anheftenden Kumuluszellen befreit. Die auf diese Weise gewonnenen Eizellen wurden in Gruppen von jeweils neun Eizellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 55 mm umgesetzt, jede einzelne Eizelle in jeweils einen Mediumtropfen (20 Mikroliter). Die Mediumtropfen wurden mit Mineralöl überschichtet und im Brutschrank bis zur morphologischen Beurteilung inkubiert.

Da pro Maus 20 bis 25 Eizellen gewonnen werden konnten und meistens zwei Mäuse pro Versuchseinheit superovuliert wurden, standen pro Versuchstag durchschnittlich 45 bis 50 Eizellen zur Verfügung.

Fixierungslösungen

Bevor mit der Hybridisierung der Eizellen begonnen werden konnte, mussten diese zunächst auf Objektträgern fixiert werden.

2.3.2 Durchführung

a) Morphologische Beurteilung

Mit Hilfe des Invertmikroskopes wurden die unfixierten Eizellen hinsichtlich morphologischer Kriterien beurteilt. Eizellen ohne Polkörper blieben unberücksichtigt. Die übrigen Eizellen, die einen Polkörper aufwiesen, wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung in vier Gruppen eingeteilt (Abbildungen 9-12):

Gruppe 1: für „optimal“ gehalten; großer, runder Polkörper; helles, glattes, homogenes Zytoplasma ohne Einschlüsse; keine Erweiterung des Perivitellinen Raumes



Abbildung 9: Eizelle, Gruppe 1 (eigenes Bild)

Gruppe 2: „suboptimal“; ovaler Polkörper; inhomogenes, grobkörniges Eizellzytoplasma; Eizelldurchmesser gegenüber „optimalen“ Eizellen verringert



Abbildung 10: Eizelle, Gruppe 2 (eigenes Bild)

Gruppe 3: deutlich verkleinerter, degenerierender Polkörper; dunkles, inhomogenes, feinkörniges Eizellzytoplasma; Eizelldurchmesser gegenüber „suboptimalen“ Eizellen verkleinert



Abbildung 11: Eizelle, Gruppe 3 (eigenes Bild)

Gruppe 4: degenerierter, atrophierter, auch fragmentierter Polkörper; dunkles homogenes Eizellzytoplasma, erweiterter Perivitelliner Raum



Abbildung 12: Eizelle, Gruppe 4 (eigenes Bild)

b) Biometrische Ausmessung

Zur genauen Ausmessung der Eizellen (Durchmesser von Eizelle und Polkörper, Breite der Zona Pellucida, Größe von Perivitellinem Raum und Zytoplasmamenge) wurde mit einem digitalen Bildverarbeitungsprogramm gearbeitet. Die Messungen wurden jeweils im Hinblick auf die vorher bestimmte Gruppenzugehörigkeit durchgeführt.

Insgesamt wurden 223 Eizellen nach ihren biometrischen Eigenschaften bestimmt. Dabei wurden diejenigen Eizellen ausgewählt, die einer der vier morphologischen Gruppen zugeordnet werden konnten. Aus der Messung ausgeschlossen wurden Eizellen, die keinen Polkörper besaßen, fragmentiert oder degeneriert waren.

Die Bestimmung der Polkörpergröße erfolgte durch Messung seines Längs- sowie Querdurchmessers (Abbildung 13). Die Maße der beiden sich daraus ergebenden und sich im rechten Winkel kreuzenden Achsen wurden summiert und durch zwei geteilt. Dieser so bestimmte Mittelwert gab definitionsgemäß die Größe des jeweiligen Polkörpers an.



Abbildung 13: Polkörper-Biometrie (eigenes Bild)

Ermittlung der Polkörper-Biometrie durch Bestimmung von Längs- und Querdurchmesser.

Die Größe des Zytoplasmavolumens ließ sich wie zur Bestimmung der Polkörpergröße durch Messung von Längs- und Querdurchmesser ermitteln (Abbildung 14) mit nachfolgender Errechnung des Mittelwertes.



Abbildung 14: Biometrie von Zona Pellucida, Perivitellinem Raum, Zytoplasma und Eizellgesamtdurchmesser (eigenes Bild)

Bestimmung von Zytoplasmavolumen (größter und kleinster Zytoplasmadurchmesser), Eizellgesamtdurchmesser (größter und kleinster Durchmesser), Dicke von Zona Pellucida (dickster und dünnster Bereich) und Größe Perivitelliner Raum (kleinster und größter Bereich), jeweils Bildung des Mittelwertes.

Zur Bestimmung der Breite des Perivitellinen Raumes wurden jeweils größter und kleinster Abstand zur Innenwand der umgebenden Zona Pellucida ermittelt. Diese beiden Abstände lagen sich aufgrund der Lage des Zytoplasmas jeweils gegenüber. Aus den beiden Werte wurde anschließend der Mittelwert errechnet.

Die Ausmessung der Zona Pellucida-Dicke erfolgte durch Bestimmung der Strecke zwischen Außen- und Innenwand der Zona an zwei sich gegenüberliegenden Bereichen der Zona Pellucida. Auch hier war die nachfolgende Festlegung eines Mittelwertes erforderlich.

Der Eizell-Gesamtdurchmesser wurde durch Messung der Strecke zwischen einem Punkt auf der Außenseite der Zona Pellucida zum gegenüberliegenden Punkt der Außenwand der Zona Pellucida bestimmt. Die Berechnung des Mittelwertes aus Längs- und Querdurchmesser der beiden sich im rechten Winkel kreuzenden Achsen ergab den Gesamtdurchmesser der Eizelle.

c) **Fixierung**

Nach morphologischer und biometrischer Bestimmung wurden die Eizellen für die Hybridisierung vorbereitet und auf Objektträgern fixiert. Durch die Fixierung war es möglich, einerseits Eihülle und Zytoplasma zu entfernen, andererseits gelang es durch die nun mögliche Ausbreitung der Chromosomen, diese sicht- und darstellbar zu machen.

Grundsätzlich müssen zwei Verfahren zur Oozytenfixierung unterschieden werden:

1. Methode nach Tarkowski (1966)
2. Gradual Fixation-Air-Drying (GF-AD)-Technik der Arbeitsgruppe um Mikamo und Kamiguchi (1986)

Fixierungslösung	Zusammensetzung	Temperatur	Inkubation
hypotone Lösung	Sodiumcitrat 1%	Raumtemperatur	8-10 Minuten
Fixation 1	Methanol:Eisessig:Wasser = 5:4:1	Raumtemperatur	3-5 Minuten
Fixation 2	Methanol:Eisessig = 3:1	Raumtemperatur	10 Minuten
Fixation 3	Methanol:Eisessig:Wasser = 3:3:1	Raumtemperatur	1 Minute

Tabelle 2: Fixierungsmethode nach Mikamo und Kamiguchi

Tabelle 2 gibt die verschiedenen Fixierungslösungen und deren Inkubationszeiten wieder, die nach Mikamo und Kamiguchi benötigt werden.

Unsere Fixierungsmethode (Tabelle 2) stellt eine vereinfachte Form des Verfahrens nach Kamiguchi und Mikamo dar.

Zunächst wurden die Eizellen mit Hilfe einer Glaspipette aus dem Aufbewahrungsmedium in Waschmedium (IVF-Universalmedium) gegeben und dort durch mehrmaliges Ansaugen in eine neue Glaspipette von Mineralölresten befreit. Von dort wurden sie, ebenfalls mit einer Glaspipette, für 6 Minuten bei Raumtemperatur in 0,9%-ige hypotone Sodiumcitratlösung umgesetzt. Dadurch gelang es, die Oozyten anschwellen zu lassen. Nun wurden diese, zusammen mit geringen Mengen Sodiumcitratlösung, mit einer Glaspipette auf einen eingekreisten Bereich des gereinigten und markierten Objektträgers gegeben. Dies sollte die Eizelle vor Austrocknung schützen. Mit einer sehr dünnlumigen Pipette wurden nun die Sodiumcitratreste um die Eizelle herum abgesaugt und es wurde einige Sekunden gewartet, bis die Eizellunterseite auf dem Objektträger leicht angetrocknet war. Nun wurden sofort und unter genauer mikroskopischer Kontrolle 2 µl der Fixierungslösung A (Methanol und Eisessig im Verhältnis 1:1) bei Raumtemperatur in die unmittelbare Nähe der Eizelle gegeben. Die Fixierungslösung breitete sich vom Rand her über die Eizelle aus, die Zona Pellucida platzte sofort auf und die Chromosomen wurden gespreitet. Im Anschluss daran wurden 2 µl Fixierungslösung B (Mischungsverhältnis von Methanol und Eisessig 3:1) mit einer serologischen Pipette auf den markierten Objektträgerbereich gegeben. Direkt im Anschluss wurde der Objektträger für weitere 5 Minuten in Fixierungslösung B gegeben, bevor er dann für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert wurde. Dadurch ließ sich eine maximale Spreitung der Chromosomen erreichen.

Abschließend konnten mikroskopisch die exakten Koordinaten der ausgebreiteten Chromosomen bestimmt werden.

Bevor mit der Hybridisierung (FISH, Fluoreszenz In Situ Hybridisierung) fortgefahren werden konnte, wurden die Objektträger für 3 Minuten in PBS gespült und durch eine Alkoholreihe (70%, 90% und 100% bei Raumtemperatur für jeweils 2 Minuten) dehydriert, trocknen gelassen, um anschließend bei -70°C eingefroren zu werden.

d) Hybridisierung

Zunächst wurden die Chromosomen auf dem Objektträger bei 70°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) in einer Denaturierungspufferlösung (70% Formamide / 2×SSC) für 2 Minuten denaturiert (Tabelle 3).

Bestandteile	Menge
Formamide	70 ml
20mal SSC	10 ml
Wasser	20 ml
gesamt	100 ml

Tabelle 3: Denaturierungspufferlösung

Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der Denaturierungspufferlösung.

Formamide wurde verwendet, um die Denaturierungstemperatur der DNA zu senken. SSC ist eine Mixtur, bestehend aus Natriumchlorid und Natriumcitrat, durch die ein hoher Salzgehalt entsteht, der die Denaturierungseffektivität erhöht (Tabelle 4). Es wird ein Vorrat von 20 × SSC angelegt, von dem entsprechende Portionen entnommen werden.

Bestandteile	Menge
Natrium-Citrat	88,23 g
Natrium-Chlorid	175,32 g
Wasser	1000 ml

Tabelle 4: 20 × SSC (pH 7,0)

Natrium-Citrat und Natrium-Chlorid
in etwas Aqua dest. lösen (600 ml),
auf 850 ml auffüllen, pH-Wert
ausgleichen

Tabelle 4 gibt die Zusammensetzung von SSC wieder.

Anschließend wurden die Oozyten in einer Ethanolreihe dehydriert: zunächst in eiskaltem Ethanol 70%, dann bei Raumtemperatur in 90% und 100% für jeweils 2 Minuten. Dann wurden die Objektträger bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Sonden-Vorbereitung

Pro Eizelle wurden jeweils 1,3µl der Sondenlösung benötigt. Die abgemessene Menge wurde bei 72°C (±2°C) für 5 Minuten denaturiert. Sofort im Anschluss wurde die Sonde für 3 Minuten in einen Eisblock gegeben. Nun wurde die Sonde auf den markierten Bereich des Objektträgers gegeben, auf dem sich die Chromosomen befinden, und mit einem Deckglas bedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit flüssiger Klebstoffmasse (FixoGum) versiegelt, um günstigste Verhältnisse für die Hybridisierung zu schaffen.

Hybridisierung

Die vorbereiteten Objektträger wurden für 12-16 Stunden in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert.

Waschen

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger für zwei Minuten in 72°C warme Waschlösung A (0,5 × SSC, Tabelle 5) gegeben. Anschließend wurden sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur und völliger Dunkelheit in Waschlösung B (SSCT, Tabelle 6) gegeben, um unspezifische fluoreszierende Signale zu entfernen. Zur Dehydrierung wurden sie dann nacheinander für jeweils 2 Minuten, ebenfalls von Licht abgeschirmt und bei Raumtemperatur, in 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen.

Bestandteile	Menge
20mal SSC	2,5 ml
Aqua dest.	97,5 ml

Tabelle 5: Waschlösung A

Bestandteile	Menge
20mal SSC	100 ml
Tween 0,05%	230l
Aqua dest.	400 ml

Tabelle 6: Waschlösung B

Die Tabellen 5 und 6 geben die Zusammensetzungen der beiden Waschlösungen wieder.

Färbung

Um die Chromosomen in Form von Signalen ausmachen zu können, wurden jeweils 2 µl DAPI/Antifade auf den markierten Objektträgerbereich gegeben (0,02 µl/ml zu 0,1 µl/ml) und mit einem Deckglas bedeckt. Antifade wird benutzt, um ein Ausbleichen zu vermeiden, welches die fluoreszierende Wirkung vermindern kann. DAPI ist eine fluoreszierende Farbe, die spezifisch an AT-Regionen der DNA bindet. Sie wird dazu benutzt, den Nukleolus oder Chromosomen in der Metaphase anzufärben und darstellbar zu machen.

Das Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) war mit Fluoreszenzfiltern ausgestattet, die eine Darstellung der angefärbten Chromosomen ermöglichten.

Die Bilder wurden mit einer elektronischen CCD-Kamera aufgenommen (Charge Coupled Device) und anschließend analysiert.

2.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines SPSS-Programmpaketes in der Version 13.0 durchgeführt.

Die gemessenen Parameter (Polkörper, Zona Pellucida, Perivitelliner Raum, Zytoplasma und Gesamtdurchmesser der Eizelle) wurden durch Mittelwerte sowie Standardabweichungen beschrieben.

Zunächst wurde die Varianzhomogenität mittels des Levene's Tests geprüft. Dieser Test war Voraussetzung für die sich anschließende Durchführung des t-Tests, mit dem die Gleichheit der Mittelwerte überprüft wird.

Es wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% geprüft ($p \leq 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

Untersucht wurden Eizellen von Mäuseweibchen, die zuvor mit PMSG und HCG superovuliert wurden. Insgesamt sind auf diese Weise 1821 Oozyten gewonnen worden, es standen 87 Mäuse in 37 Versuchseinheiten zur Verfügung. Ein geringer Anteil der Eizellen ging während der Eizellpräparation verloren. Morphologisch wurden die 1821 Eizellen nach dem Vorhandensein eines Polkörpers untersucht und diese anschließend in 4 Gruppen unterteilt. Als Untersuchungsgut wurden nur diejenigen Eizellen verwendet, die sich im Stadium der Metaphase II befanden, also einen Polkörper ausgebildet hatten. Somit reduzierte sich die Anzahl der zu untersuchenden Eizellen auf insgesamt 884 Eizellen aus 37 Versuchseinheiten.

Zur Ausmessung und biometrischen Auswertung kam es an 223 Eizellen aus 15 Versuchseinheiten, die vorherigen Versuche werden als Vorversuche angesehen (Tabelle 7, Ergebnisse).

Es wurden insgesamt 205 Oozyten fixiert und hybridisiert. Zur Fixierung und Hybridisierung nach vorangegangener biometrischer Bestimmung kam es an 98 Eizellen, deren Chromosomen anschließend auf Aneuploidien untersucht wurden (Tabelle 7).

Auf diese Weise entstanden im Zellkulturlabor der Frauenklinik der Universität Kiel 98 Eizellpräparate, die mittels FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung) untersucht werden konnten.

Biometrie	
Polkörper	223 Eizellen
Perivitelliner Raum	230 Eizellen
Zona Pellucida	230 Eizellen
Zytoplasma	230 Eizellen
Eizelldurchmesser	228 Eizellen
Hybridisierung	205 Eizellen
auswertbar	98 Eizellen (47,8%)
nicht auswertbar	107 Eizellen (52,2%)
Biometrie + Hybridisierung	98 Eizellen (47,8%)

Tabelle 7: Eizell-Selektion

Tabelle 7 liefert einen Überblick über die Anzahl biometrisch bestimmter Eizellen, hybridisierter Eizellen sowie biometrisch bestimmter und hybridisierter Eizellen.

3.2 Versuchsaufbau

Es fanden insgesamt 37 Versuchseinheiten statt.

Zunächst wurde hinsichtlich Mäuseanzahl pro Versuch und Stimulationsdosis variiert. Besonders aus ethischer Sicht war es das Ziel, die Anzahl der pro Versuch zur Verfügung stehenden Mäuse zu minimieren. Entsprechend wurde die Stimulationsdosis verändert, um die Eizellausbeute pro Maus zu optimieren. Von Versuch 9 an wurden statt zuvor 4 nur noch 2 Mäuse pro Versuch behandelt. In Versuch 15 legten wir die Stimulationsdosis (10 IU PMSG in 200µl NaCl und 10 IU HCG in 200µl NaCl) fest.

Das Mäusealter wurde während der Versuche nicht berücksichtigt, lediglich dokumentiert, um zu der Feststellung zu gelangen, dass die durchschnittliche Eizellmenge pro Maus mit zunehmendem Mäusealter abnimmt (Diagramm 1: Eizellmenge und Alter der Mäuse).

Die Versuche 1 bis 17 können als Vorversuche betrachtet werden, ab Versuch 18 wurden die gewonnenen und morphologisch beurteilten Eizellen biometrisch bestimmt, fixiert und hybridisiert. Bedingt durch die zunehmende Beherrschung der unterschiedlichen Arbeitsschritte konnte die Anzahl der biometrisch bestimmten, fixierten und hybridisierten Eizellen pro Versuch gesteigert werden (Tabelle 8).

Versuch	Anzahl Maus	Alter Maus (d)	PMSG (IU) / NaCl (µl)	HCG (IU) / NaCl (µl)	Morphol. (Anz. EZ)	Biometrie (Anz. EZ)	Fixierung (Anz. EZ)	Hybrid. (Anz. EZ)
1	4	keine Ang.	5 / 200	5 / 200	0	0	0	0
2	4	keine Ang.	5 / 200	5 / 200	10	0	0	0
3	4	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	15	0	0	0
4	4	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	44	0	0	0
5	4	keine Ang.	7,5 / 300	7,5 / 300	10	0	0	0
6	4	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	37	0	0	0
7	4	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	83	0	0	0
8	4	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	34	0	0	0
9	2	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	22	0	0	0
10	2	keine Ang.	10 / 400	10 / 400	19	0	0	0
11	2	71	10 / 400	10 / 400	14	0	1	0
12	2	72	10 / 400	10 / 400	33	0	0	0
13	2	79	10 / 400	10 / 400	14	0	0	0
14	2	85	10 / 400	10 / 400	34	0	0	0
15	2	89	10 / 200	10 / 200	64	0	5	0
16	2	92	10 / 200	10 / 200	36	0	3	0
17	2	70	10 / 200	10 / 200	30	0	5	0
18	2	72	10 / 200	10 / 200	39	15	1	7
19	2	75	10 / 200	10 / 200	66	24	5	7
20	2	78	10 / 200	10 / 200	44	17	5	3
21	2	79	10 / 200	10 / 200	32	11	11	4
22	2	82	10 / 200	10 / 200	35	10	8	2
23	1	84	10 / 200	10 / 200	9	0	4	0
24	2	66	10 / 200	10 / 200	60	11	7	3
25	2	85	10 / 200	10 / 200	93	12	11	6
26	1	64	10 / 200	10 / 200	54	10	12	3
27	2	71	10 / 200	10 / 200	110	17	14	9
28	1	76	10 / 200	10 / 200	35	0	3	0
29	2	78	10 / 200	10 / 200	79	0	0	0
30	2	83	10 / 200	10 / 200	84	10	10	7
31	2	85	10 / 200	10 / 200	63	18	19	8
32	2	63	10 / 200	10 / 200	97	0	15	0
33	2	71	10 / 200	10 / 200	93	13	14	2
34	2	73	10 / 200	10 / 200	102	17	16	8
35	2	93	10 / 200	10 / 200	59	0	0	0
36	2	100	10 / 200	10 / 200	63	17	15	12
37	2	102	10 / 200	10 / 200	105	21	21	17
gesamt	87				1821	223	205	98

Tabelle 8: Versuchsaufbau

Diese Tabelle (Tabelle 8) gibt einen Überblick über die einzelnen Versuchseinheiten hinsichtlich Mäuseanzahl, Alter der Mäuse, Konzentration PMSG und HCG, Anzahl morphologisch und biometrisch bestimmter Eizellen sowie fixierter und hybridisierter Eizellen pro Versuch.

3.3 Mäuse

Die von 98 Eizellen stammenden und untersuchten Chromsomen wurden von 29 Mäusen aus 15 Versuchseinheiten gewonnen. Die Anzahl der untersuchten Eizellen pro Maus lag bei durchschnittlich 36 Eizellen (Minimum 16, Maximum 55 Eizellen pro Maus).

Insgesamt ergab sich eine durchschnittliche Eizellmenge von 21 Eizellen pro Maus, bei Einbeziehung aller zur Verfügung gestandenen Mäuse (Minimum 3 und Maximum 55 Eizellen pro Maus).

Das durchschnittliche Alter der Mäuse, deren Eizellen gewonnen und biometrisch bestimmt wurden, betrug am Tag der Eizellgewinnung 80 Tage (11,4 Wochen). Die jüngste Maus wurde mit 64 Tagen geopfert, die älteste Maus mit 102 Tagen. Der Medianwert beträgt 78 Tage.

Eine Übersicht zeigen die nachstehenden Tabellen 9 und 10.

Anzahl der Mäuse	87
Durchschnittsalter aller Mäuse	80 Tage
Minimum	64 Tage
Maximum	102 Tage
Median	78 Tage
Stimulation	HCG, PMSG
Anzahl der gewonnenen Eizellen	1821
Anzahl der untersuchten Eizellen mit Polkörper (Morphologie)	884
Biometrie	223
Anzahl der fixierten Eizellen	205
Anzahl der hybridisierten Eizellen	205
davon auswertbar	98
davon nicht auswertbar	107
mit biometrischer Bestimmung	98
beurteilbares Chromosom 16 nach erfolgreicher Hybridisierung	79
Aneuploidien	19

Tabelle 9: Ergebnisübersicht

In Tabelle 9 sind Anzahl und Alter der Mäuse sowie Menge der untersuchten Eizellen (Morphologie, Biometrie, Fixierung, Hybridisierung, Beurteilbarkeit Chromosom 16, Aneuploidien) dargestellt.

Anzahl der gewonnenen Eizellen	1821
Minimum pro Maus	3
Maximum pro Maus	55
Mittelwert pro Maus	21
Median	21

Tabelle 10: Übersicht Eizellen pro Maus

In Tabelle 10 sind die Eizellmenge pro Maus wiedergegeben.

a) Einfluss des Alters der Maus

Alle an den Versuchseinheiten teilgenommenen Mäuse befanden sich in der Geschlechtsreife. Das Alter der Mäuse variierte jedoch in einem Bereich von fünf Wochen. Es zeigte sich, dass das Alter keine wesentliche Einflussgröße auf die maximal zu erlangende Eizellmenge darstellte. Einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Mäuse und der jeweils gewonnenen Eizellmenge stellen die folgenden Grafiken (Diagramm 1 und 2) dar.

Eine Aussage über unterschiedliche Eizellmengen in Abhängigkeit vom Alter der Maus lässt sich anhand unserer Untersuchungen nicht machen.

Eizellmenge und Mäusealter

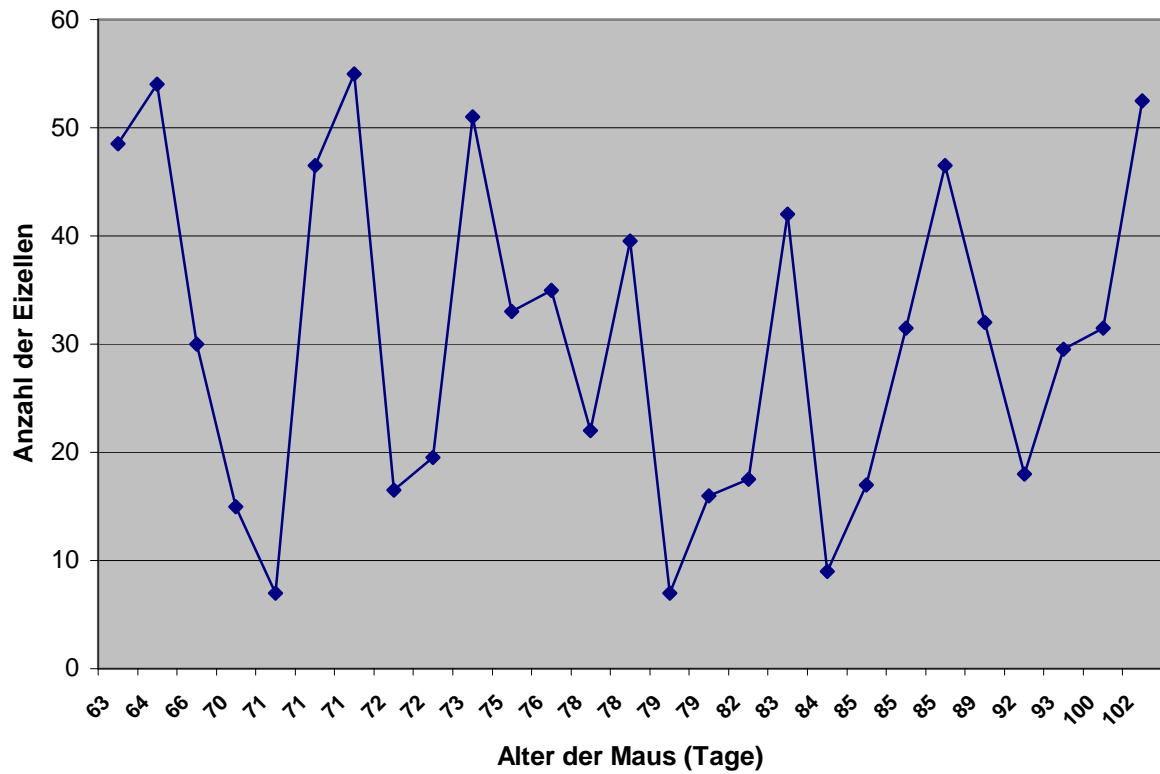


Diagramm 1: Eizellmenge und Alter der Mäuse

Dieses Diagramm (Diagramm 1) gibt graphisch wieder, wie viele Eizellen bei unterschiedlich alten Mäusen gewonnen werden konnten.

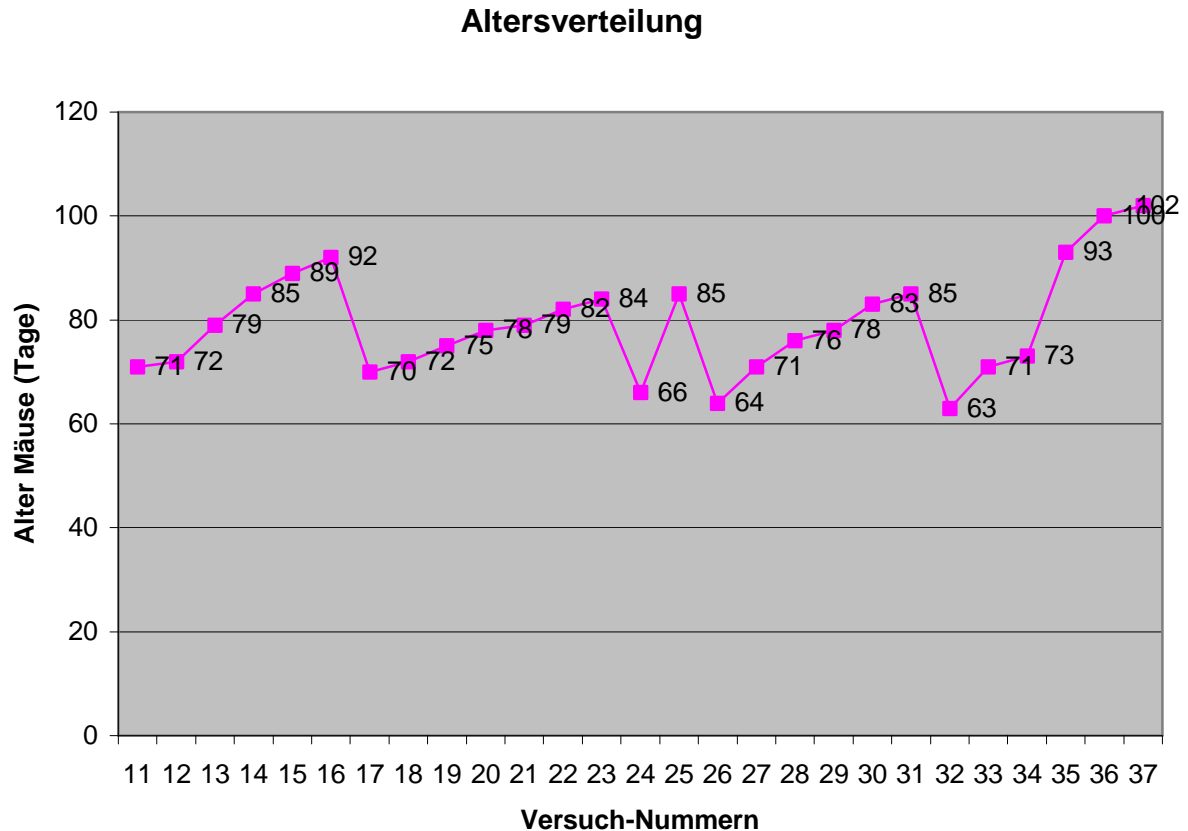


Diagramm 2: Altersverteilung

Anhand des Diagramms 2 wird die unterschiedliche Altersverteilung der Mäuse während der Versuchseinheiten veranschaulicht. Die Versuchsnummern sind chronologisch.

b) Eizellen

Durchschnittlich wurden pro Maus 21 Oozyten morphologisch untersucht. Zur biometrischen Ausmessung kam es im Mittel bei 15 Oozyten pro Maus.

Die Anzahl der Eizellen mit Polkörper betrug 887. Diese Eizellen haben einen Anteil von 48,5% an der Gesamtanzahl von 1821 Eizellen. Es fanden sich 774 Eizellen ohne Polkörper (42,7%). Mit einem Anteil von 8,8% konnten 160 der gewonnenen Eizellen nicht beurteilt werden, da eine Zuordnung zu einer der vier Gruppen unsicher war, die Eizellen fragmentiert oder degeneriert waren (Tabelle 11, Diagramm 3).

Eizellen gesamt	1821	100%
Eizellen mit Polkörper	884	48,5%
Eizellen ohne Polkörper	777	42,7%
keine Beurteilung möglich	160	8,8%

Tabelle 11: Eizellen

Tabelle 11 gibt wieder, wie viele Eizellen insgesamt gewonnen wurden, wie viele davon einen Polkörper besaßen, wie viele keinen ausgebildet hatten und wie oft eine Beurteilung nicht möglich war.

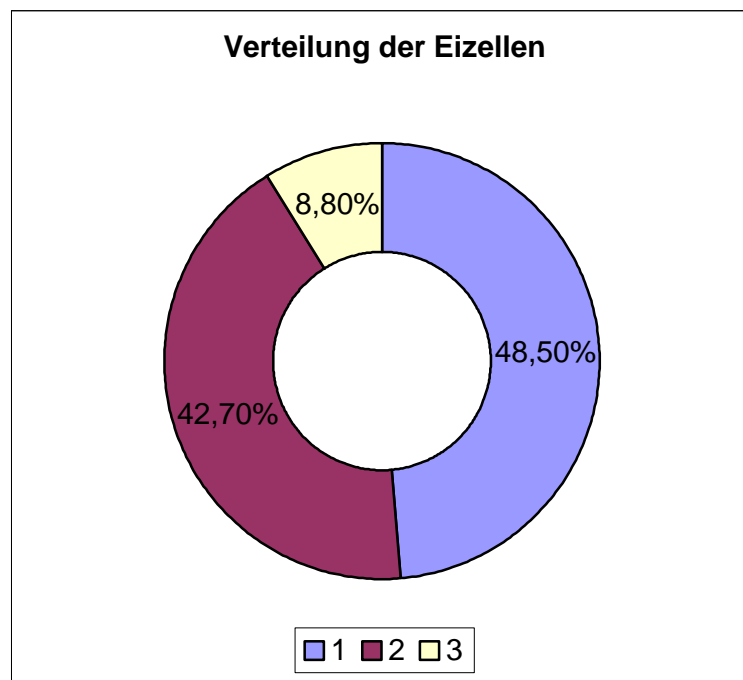


Diagramm 3: Verteilung der Eizellen

Legende: **1**: Eizellen mit Polkörper
 2: Eizellen ohne Polkörper
 3: nicht beurteilbare Eizellen
n = 1821

Das Diagramm 3 stellt die Eizellen hinsichtlich ihrer Polkörper anschaulich dar.

3.3 Effizienz

a) Superovulation

Superovuliert wurde mit PMSG (pregnant mare`s serum gonadotrophin) und HCG (human chorionic gonadotropine) im Abstand von 48 Stunden. Eine Wirkungsmaximierung wurde erzeugt durch eine ausreichende Dosierung (hohe Qualität) bei möglichst niedriger Gesamtmenge (geringe Quantität). Beste Ergebnisse, also die größte Ausbeute an Eizellen, ließen sich bei einer Konzentration von 10 IU (International Units) PMSG in 200 µl NaCl (Natriumchlorid) sowie 10 IU HCG in 200 µl NaCl (Natriumchlorid) erzielen (Tabelle 12).

PMSG	HCG	Anzahl Versuche	durchschnittliche Eizellmenge
5 IU in 200µl NaCl 0,9%	5 IU in 200µl NaCl 0,9%	2	2,5
7,5 IU in 300µl NaCl 0,9%	7,5 IU in 300µl NaCl 0,9%	1	2,75
10 IU in 400µl NaCl 0,9%	10 IU in 400µl NaCl 0,9%	11	11,02
10 IU in 200µl NaCl 0,9%	10 IU in 200µl NaCl 0,9%	23	33,74

Tabelle 12: Einfluss von PMSG und HCG auf die Gesamteizellmenge

In Tabelle 12 sind die durchschnittliche Eizellmenge in Abhängigkeit von der PMSG- und HCG-Konzentration dargestellt.

Eine zu große Gesamtmenge an zu injizierender PMSG- / HCG-Lösung bei gleichbleibender PMSG- / HCG-Konzentration schränkte die zu gewinnende Eizellmenge ein.

b) Hyaluronidase

Das Enzym Hyaluronidase wurde zur Entfernung der die Oozyten umgebenden Kumuluszellen verwendet. Da Hyaluronidase ein hohes Aggressionspotential aufweist und zur Auflösung von Gewebe führt, sind eine strenge Kontrolle der Inkubationszeit und genaueste Beachtung der Konzentration erforderlich. Eine optimale Befreiung der Oozyten aus dem Eizell-Kumuluszell-Komplex ließ sich bei einer Konzentration von 80 IU/ml und einer Einwirkzeit von 7,5 Minuten erzielen (Tabelle 13).

Hyaluronidase (IU/ml)	Anzahl Versuche	Inkubationszeit
20	5	7 - 8 Minuten
40	3	3 - 4 Minuten
80	29	1 - 8 Minuten

Tabelle 13: Effizienz von Hyaluronidase

Tabelle 13 stellt dar, welche unterschiedlichen Hyaluronidasekonzentrationen und Inkubationszeiten notwendig waren, um eine optimale Befreiung der Oozyten aus dem Eizell-Kumuluszell-Komplex zu erzielen.

c) Fixierung

Fixiert wurden Oozyten, die sich im Stadium II der Metaphase befanden und einen Polkörper besaßen. Sie waren zuvor morphologisch untersucht und klassifiziert worden. 205 Eizellen (11,3 % aller gewonnenen Eizellen) wurden nach einer modifizierten Methode von Kamiguchi und Mikamo (1976) fixiert.

In der ersten Bewertung nach Fixierung im Phasenkontrastmikroskop ließen sich die Chromosomen von 101 Eizellen gut spreiten (49,3%), bei 25 der Eizellpräparate (12,2%) lagen die Chromosomen in Form von Haufen vor, waren schlecht sichtbar (18 Eizellen, 8,8%), unvollständig (7 Eizellen, 3,4%) oder die Bewertung war fraglich (14 Eizellen, 6,8%) und somit einer Analyse nicht zugänglich. 40 Eizellen (19,5%) konnten nach der Fixierung nicht wiedergefunden werden (Diagramm 4).

Eizellen nach Fixierung

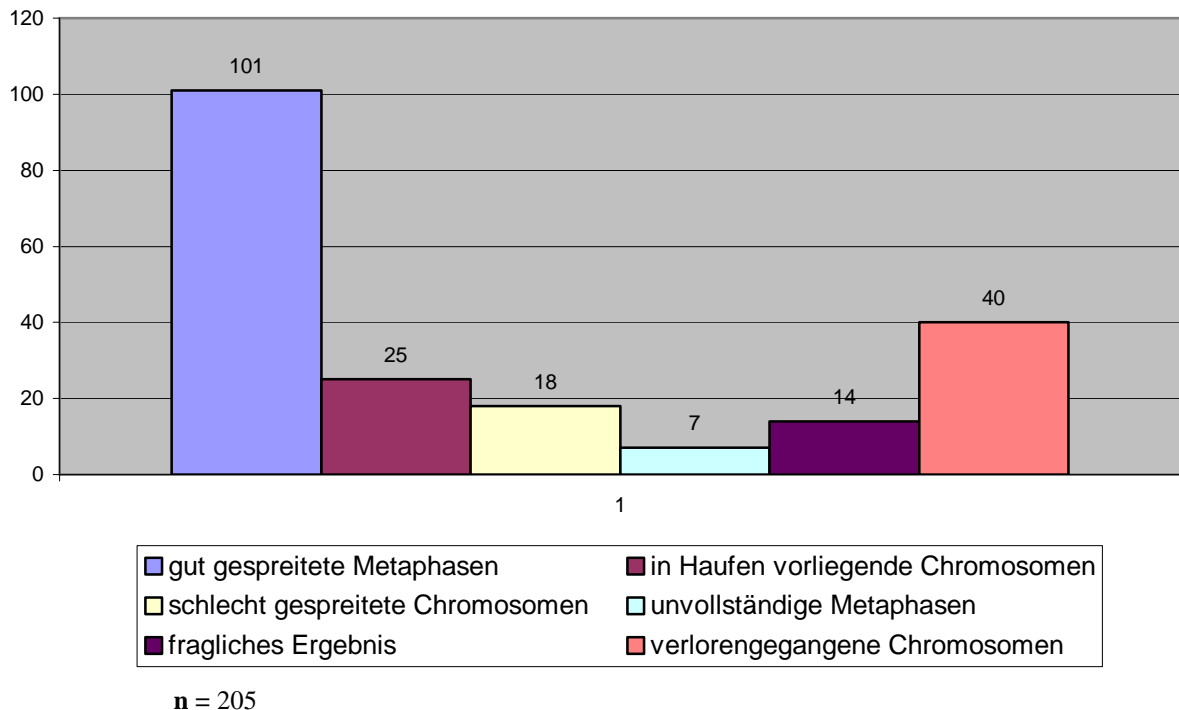


Diagramm 4: Übersicht Chromosomen-Ausbreitung

Diagramm 4 verdeutlicht, wie sich die Chromosomen nach ihrer Fixierung darstellten.

Von den 205 fixierten Oozyten wurden 98 Eizellpräparate mit Hilfe der FISH-Analyse im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (47,8 %). Die übrigen 107 Eizellpräparate (52,2 %) wurden nicht verwertet, da die Chromosomen in Haufen übereinander lagen, zu weit verstreut und unvollständig waren, ihre Signale nicht eindeutig zu bewerten oder die Chromosomen während der Fixierung verloren gegangen waren.

Von 98 Eizellpräparaten, deren Chromosom 16 nach FISH-Analyse ausgewertet wurden, waren wiederum nur 79 Eizellen einer definitiven genetischen Zuordnung möglich. Die übrigen 19 Präparate wurden erst im zweiten Schritt von der Bewertung ausgeschlossen, da eine eindeutige Beurteilung des Chromosom 16 unmöglich war.

Nicht auswertbare Eizellpräparate nach FISH (Schritt 1)

Chromosomen		
Verklumpt	25	23,4%
Unvollständig	7	6,5%
Fraglich	17	15,9%
Eizelle verloren	40	37,4%
Signale		
Undeutlich	18	16,8%
Gesamtzahl nicht auswertbarer Präparate	107	100%

Tabelle 14: nicht auswertbare Eizellpräparate nach FISH (Schritt 1)

Tabelle 14 liefert einen Überblick über die nicht auswertbaren Eizellpräparate. Es handelt sich dabei um den ersten Schritt der Beurteilung. Im zweiten Schritt (Differenzierung der Aneuploidien) kommen noch weitere 19 nicht auswertbare Eizellpräparate hinzu (Tabelle 15).

Die Effizienz der modifizierten Fixierungsmethode nach Kamiguchi und Mikamo (1986) spiegelt sich im Ausbreitungsverhalten der Chromosomen wieder.

d) FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)

Es wurden 98 Eizellpräparate mit der FISH-Methode hybridisiert und analysiert. In 19 Fällen (19,4%) war eine Interpretation und Differenzierung der Aneuploidien nicht möglich (Schritt 2 der Beurteilung der Chromosomen). Somit liegt eine Effizienz der FISH-Analyse von 80,6 % vor. In 19,4 % der Fälle versagte die Methode (Tabelle 15, Diagramm 5).

Ursache der nicht zu beurteilenden Eizellpräparate waren Artefakte, die eine Bewertung der Chromosomen und damit eine Differenzierung der Aneuploidien nicht zuließen. Diese Artefakte erschienen in Form von stark verklumpten oder fragmentierten Chromosomen. Weitere Gründe, die eine Beurteilung der Präparate unmöglich machten, waren eine zu große Verstreuung der Chromosomen oder mehrere Signale durch das Vorhandensein von Kumuluszell-DNA.

Nicht auswertbare Eizellpräparate (Schritt 2)

Summe der fixierten Präparate	205	
biometr. Bestimmung + FISH	98	100%
davon analysierbare Präparate	79	80,6%
davon nicht analysierbare Präparate	19	19,4%

Tabelle 15: Eizellpräparate nach biometrischer Bestimmung und anschließender FISH

Tabelle 15 stellt dar, wie viele Eizellpräparate nach biometrischer Bestimmung und Hybridisierung analysierbar bzw. nicht analysierbar waren.

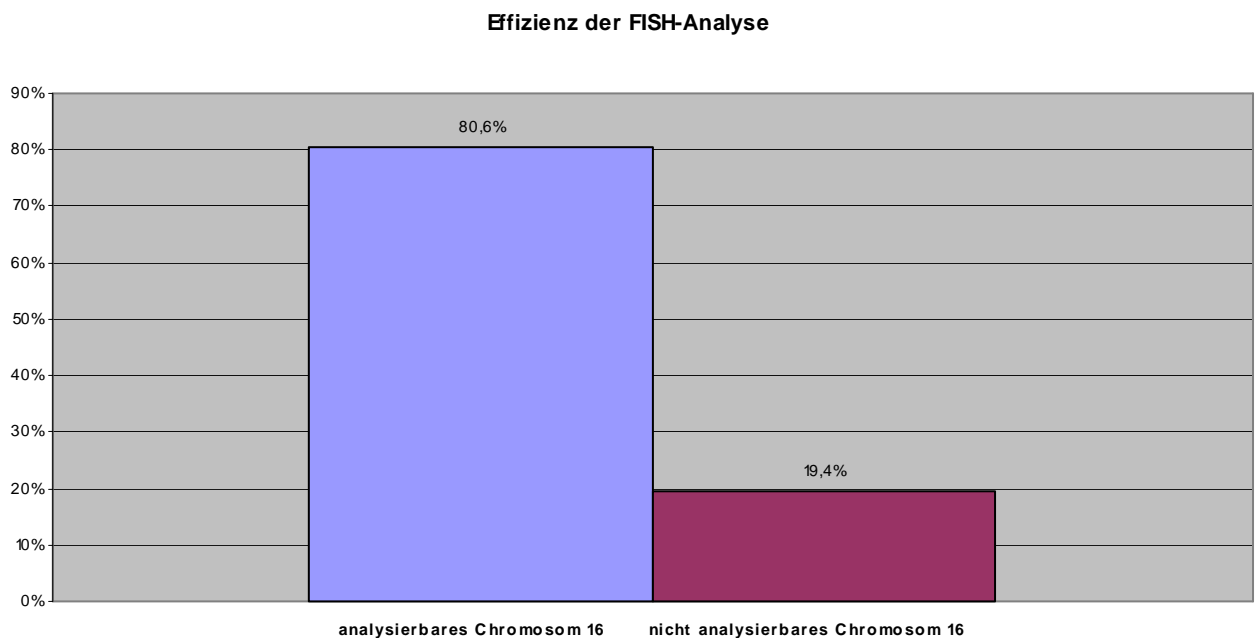


Diagramm 5: Übersicht über die Wirksamkeit der FISH-Analyse

In Diagramm 5 ist graphisch dargestellt, wie analysierbare und nicht analysierbare Chromosomen verteilt waren.

3.4 Aneuploidien

a) Darstellbarkeit von Aneuploidien

Die Darstellung chromosomaler Strukturen wurde nach Hybridisierung und DAPI-Färbung erreicht. Es kam zur Erstellung von 98 Eizellpräparaten aus 15 Versuchseinheiten (29 Mäuse). Diese Präparate waren durch den Nachweis von Chromosomen charakterisiert. Von den 98 erstellten Chromosomenpräparaten konnten 79 analysiert werden, 19 Präparate konnten nicht bewertet werden (Tabelle 16).

Da nur das Chromosom 16 dargestellt werden sollte, war die genaue und vollständige Anzahl der Chromosomen nicht entscheidend. Es wurden allerdings Eizellpräparate, die bereits während des Fixierungsvorgangs eine deutliche Unvollständigkeit der Chromosomen erkennen ließen, von einer Hybridisierung und Färbung ausgeschlossen. Präparationstechnisch bedingte numerische Aberrationen wurden nicht berücksichtigt.

Von den 79 hybridisierten und auswertbaren Eizellen wies ein großer Teil der untersuchten Eizellen (60 Eizellen, 76 %) ein normales Chromosom 16 auf. 19 Eizellen (24 %) wurden als abnormal deklariert. Die Gruppe der abnormen Chromosomen unterteilt sich in Non Disjunction + (überzähliges Chromosom) und – (vermindertes Chromosom), Balancierte Prädivision, Nicht Balancierte Prädivision + (überzählig) und – (vermindert) (Diagramm 6).

Eine Übersicht über die Verteilung der genetisch „normalen“ und genetisch „nicht normalen“ Eizellen liefert die folgende Tabelle (Tabelle 16):

Verteilung genetisch „normaler“ und „nicht normaler“ Eizellen

Versuch-Nr.	Mäuse- Anzahl	Eizellen gesamt	Biometrie & FISH	auswertbar	nicht bewertbar	genetisch "normal"	genetisch "nicht normal"
18	2	39	7	7	0	5 (6,3%)	2 (2,5%)
19	2	66	7	7	0	6 (7,6%)	1 (1,3%)
20	2	44	3	2	1	1 (1,3%)	1 (1,3%)
21	2	32	4	4	0	3 (3,8%)	1 (1,3%)
22	2	35	2	2	0	2 (2,5%)	0
24	2	60	3	3	0	3 (3,8%)	0
25	2	93	6	4	2	4 (5%)	0
26	1	54	3	2	1	2 (2,5%)	0
27	2	110	9	6	3	4 (5%)	2 (2,5%)
30	2	84	7	6	1	4 (5%)	2 (2,5%)
31	2	63	8	7	1	7 (8,9%)	0
33	2	93	2	1	1	1 (1,3%)	0
34	2	102	8	8	0	6 (7,6%)	2 (2,5%)
36	2	63	12	6	6	4 (5%)	2 (2,5%)
37	2	105	17	14	3	8 (10,1%)	6 (7,6%)
15	29	1043	98	79	19	60	19

Tabelle 16: Verteilung der genetisch „normaler“ und „nicht normaler“ Mäuseeizellen

Tabelle 16 verdeutlicht die Verteilung der genetisch untersuchten Eizellen. In insgesamt 15 Versuchseinheiten (29 Mäuse) zeigen 6 Versuche (11 Mäuse) ausschließlich Eizellen mit einem „normalen“ Chromosom 16 (60 von 79 auswertbaren Eizellpräparaten).

In Diagramm 6 ist zu sehen, welche Ergebnisse die FISH-Analyse lieferte.

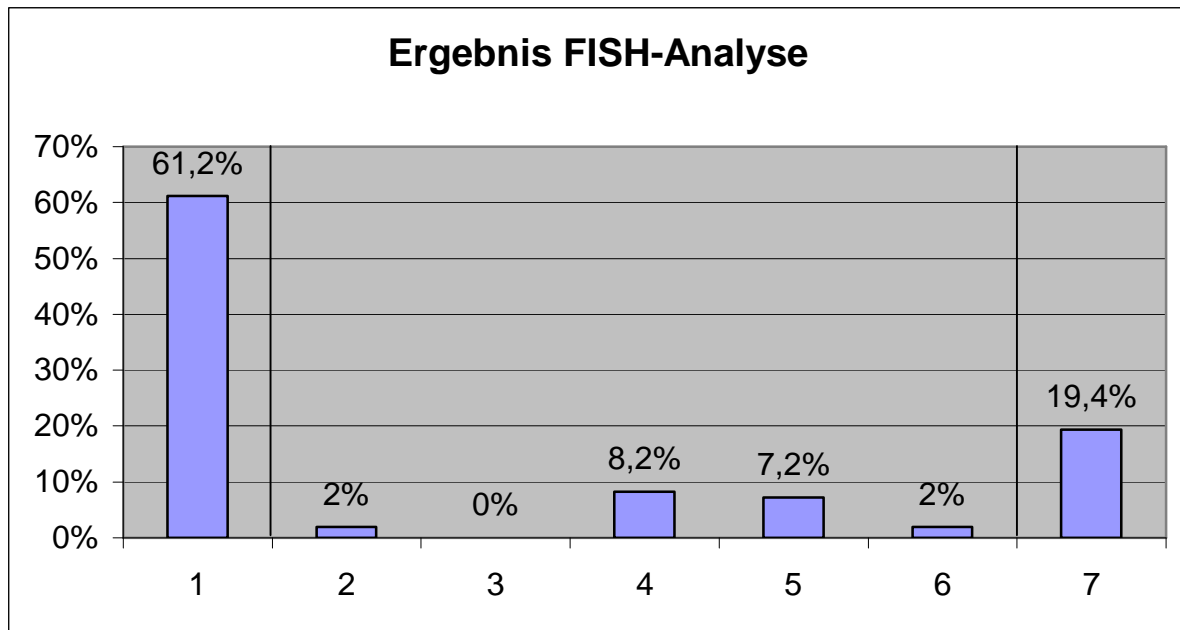


Diagramm 6: Resultat der FISH-Analyse

- Legende:
- 1 = normales Chromosom 16 (n=60)
 - 2 = Non Disjunction + (n=2)
 - 3 = Non Disjunction – (n=0)
 - 4 = balancierte Prädivision (n=8)
 - 5 = nicht balancierte Prädivision + (n=7)
 - 6 = nicht balancierte Prädivision – (n=2)
 - 7 = nicht auswertbar (n=19)

Ergebnis der FISH-Analyse	gesamt Anzahl / %	auswertbar Anzahl / %
normales Chromosom 16	60 (61,2%)	60 (76%)
Abnormal	19 (19,4%)	19 (24%)
Non Disjunction +	2 (2%)	2 (2,5%)
Non Disjunction -	0	0
balancierte Prädivision	8 (8,2%)	8 (10,1%)
nicht balancierte Prädivision +	7 (7,2%)	7 (8,9%)
nicht balancierte Prädivision -	2 (2%)	2 (2,5%)
nicht auswertbar	19 (19,4%)	-
Gesamt	98 (100%)	79 (100%)

Tabelle 17: FISH-Ergebnisse im Überblick

Tabelle 17 liefert einen Überblick über die FISH-Ergebnisse.

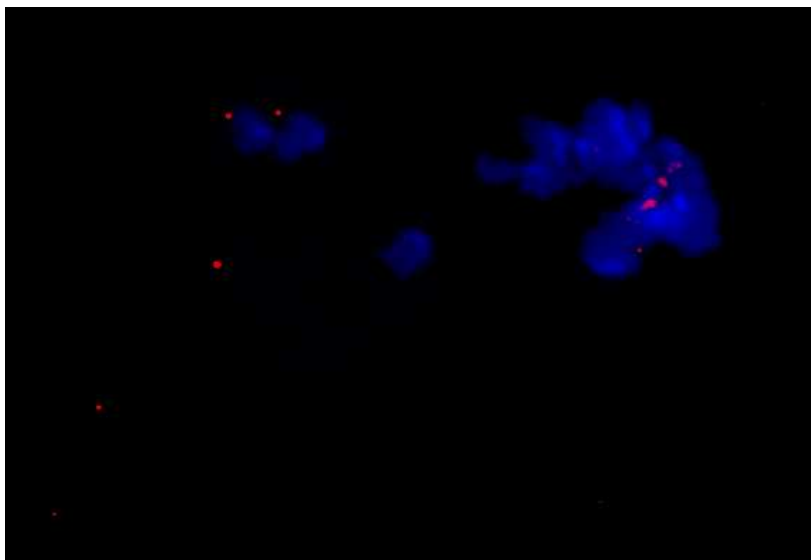


Abbildung 15: Beispiel eines FISH-Bildes (unbalancierte Prädivision)

Abbildung 15 zeigt eine unbalancierte Prädivision, dargestellt im Fluoreszenzmikroskop nach FISH und Anfärbung

b) Non Disjunction (NDJ)

Non Disjunction + (mit einem überzähligen Chromosom) wurde in 2 Fällen gefunden. Diese Chromosomenanomalie stellt einen Anteil von 2% an der Gesamtmenge und 2,5% der auswertbaren Eizellpräparate dar. Non Disjunction mit einem verminderten Chromosom (NDJ -) trat in unseren Untersuchungen nicht auf.

c) Balancierte Prädivision (bp)

Bei 8 der untersuchten Chromosomen wurde eine Balancierte Prädivision gefunden. Ihr Anteil beträgt 8,2% (10,1% der auswertbaren Präparate).

d) Unbalancierte Prädivision (ubpd)

Die Aneuploidieform mit nur einem abgeschnürten Chromatid (upd +) fand sich bei 7 der untersuchten Chromosomen (7,2% der gesamten FISH-Präparate, 8,9% der auswertbaren hybridisierten Eizellen). Eine unbalancierte Prädivision – trat zweimal auf (2% gesamt, 2,5% auswertbar).

3.5 Morphologie

Zunächst wurden die 1821 präparierten Eizellen nach dem Vorhandensein eines Polkörpers untersucht. Anschließend wurden 887 Eizellen, die einen Polkörper aufwiesen, in 4 unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Eine eindeutige Zuordnung war bei 846 Eizellen möglich. Jeweils für den Polkörper und das Zytoplasma getrennt, wurden die Eizellen kategorisiert. Auf diese Weise entstanden 16 ($4 \text{ Polkörper} \times 4 \text{ Zytoplasma}$) verschiedene morphologische Kombinationsmöglichkeiten. Die erste Zahl der Benennung gibt jeweils den Polkörper, die zweite Zahl die Beurteilung des Zytoplasmas an (Beispiel: 2/3 bedeutet Note 2 für den Polkörper, Note 3 für das Zytoplasma).

Einen Überblick über die Einteilungskriterien gibt die folgende Tabelle 18:

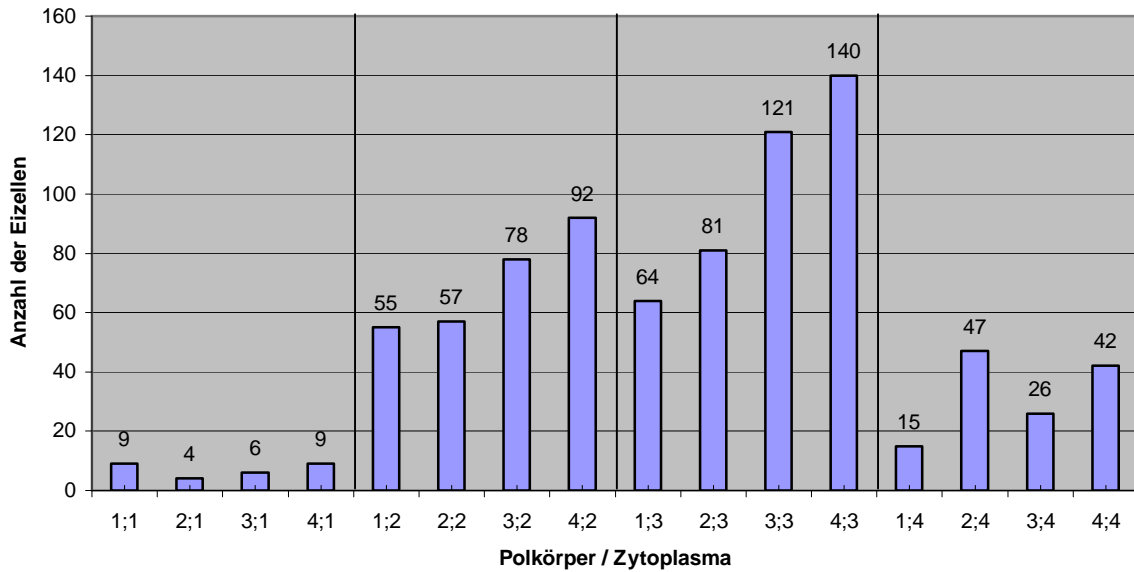
Morphologische Gruppen	Eigenschaften Polkörper	Eigenschaften Zytoplasma
1	"optimal": großer, runder Polkörper	"optimale" Eizelle großer Gesamtdurchmesser helles, glattes, homogenes Zytoplasma keine Zytoplasmaeinschlüsse Perivitelliner Raum nicht erweitert
2	"suboptimal": ovaler, großer Polkörper	"suboptimale" Eizelle Gesamtdurchmesser verringert inhomogenes Zytoplasma mit grobscholligen Einschlüssen
3	Deutlich verkleinerter, degenerierender Polkörper	dunkles, inhomogenes, feinscholliges Zytoplasma Zytoplasmaeinschlüsse Eizelldurchmesser weiter verkleinert
4	Polkörper degeneriert, atrophiert oder fragmentiert	dunkles, homogenes Zytoplasma kleiner Gesamtdurchmesser erweiterter Perivitelliner Raum

Tabelle 18: Einteilung der Eizelle in 4 morphologische Gruppen

In Tabelle 18 werden die vier morphologischen Gruppen hinsichtlich Polkörper und Zytoplasma beschrieben.

Im Einzelnen wurden die verschiedenen Gruppen unterschiedlich häufig gefunden. Von 846 morphologisch bestimmten Eizellen waren Eizellen mit der Bewertung 4/3 (Polkörper Note 4, Zytoplasma Note 3) am häufigsten. Sie fanden sich bei 140 Eizellen (16,6%). Mit insgesamt 4 von 846 gemessenen Eizellen (0,5%) fanden sich die Eizellen mit der Bewertung 2/1 am seltensten. Einen Überblick über die Verteilung der morphologischen Gruppen geben die folgenden Diagramme (Diagramm 7-10) sowie Tabelle 18 wieder.

Morphologische Gruppen (Zytoplasma 1 - 4)

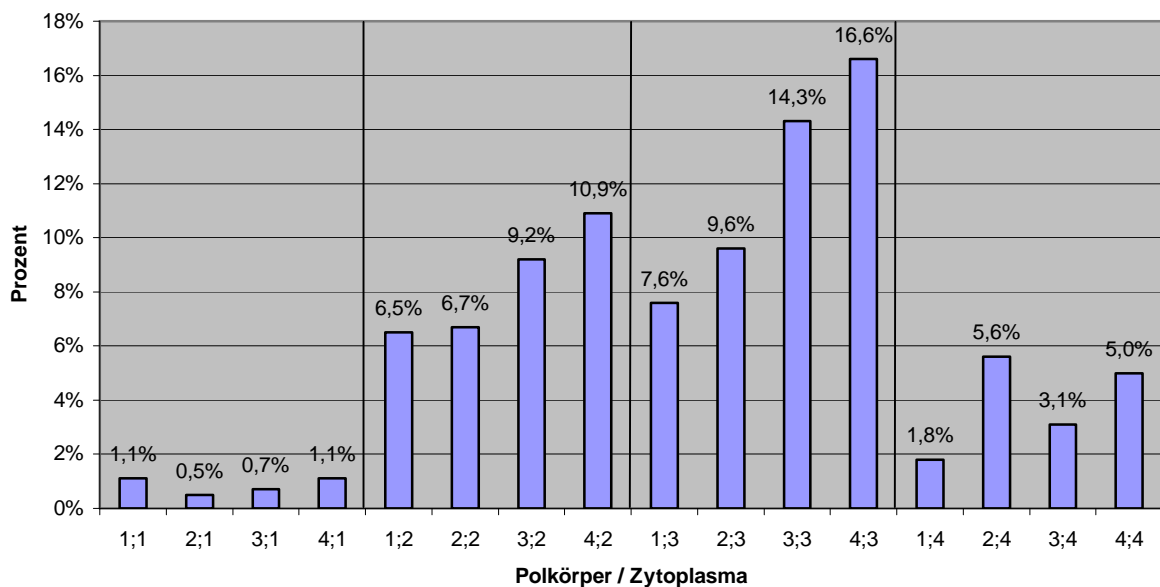


n = 846

Diagramm 7: Verteilung der morphologischen Eizell-Gruppen (Zytoplasma 1-4)

In diesem Diagramm 7 ist dargestellt, wie häufig die verschiedenen morphologischen Gruppen gefunden wurden.

Prozentuale Verteilung der Eizell-Gruppen (Zytopl. 1 - 4)

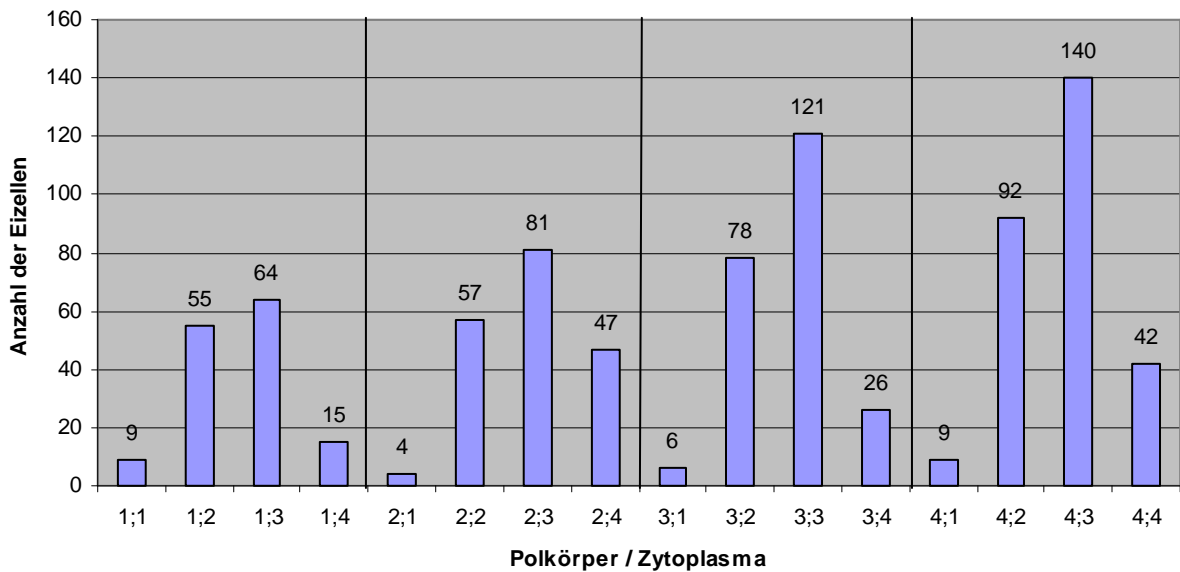


n = 846

Diagramm 8: Prozentuale Verteilung der morphologischen Eizell-Gruppen (Zytoplasma 1-4)

Diagramm 8 gibt die prozentuale Verteilung der Eizell-Gruppen wieder.

Morphologische Gruppen (Polkörper 1 - 4)

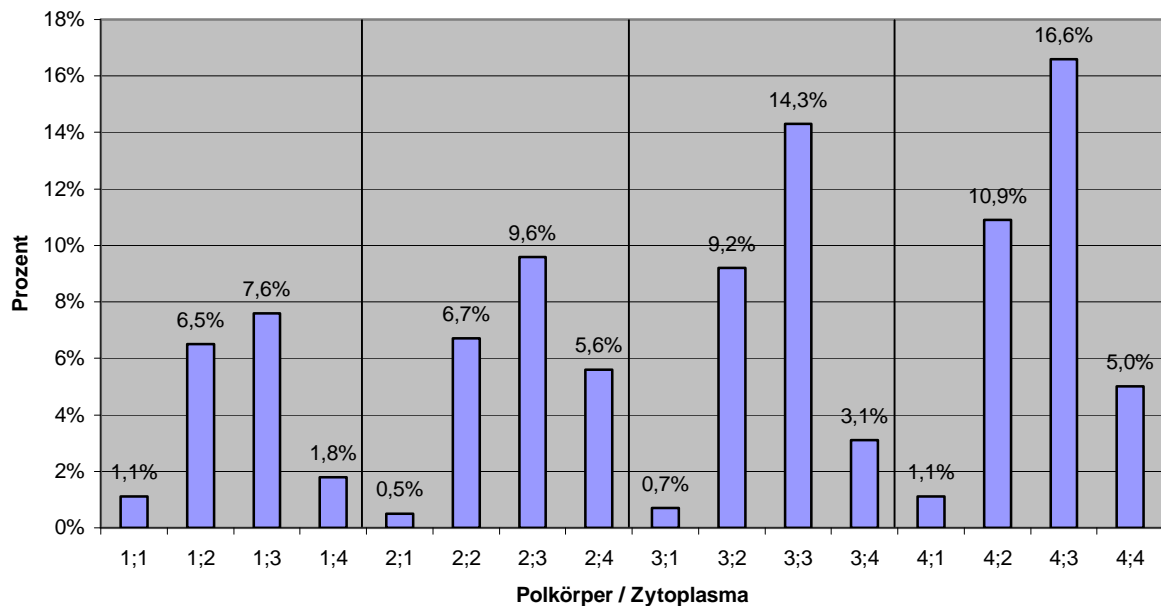


n = 846

Diagramm 9: Verteilung der morphologischen Eizell-Gruppen (Polkörper 1-4)

Diagramm 9 zeigt, wie häufig die verschiedenen morphologischen Gruppen gefunden wurden.

Prozentuale Verteilung der Eizellgruppen (Polkörper 1 - 4)



n = 846

Diagramm 10: Prozentuale Verteilung der morphologischen Eizell-Gruppen (Polkörper 1-4)

Diagramm 10 gibt die prozentuale Verteilung der Eizell-Gruppen wieder.

Morphologie (Polk./Zytopl.)	Anzahl	%	Morphologie (Polk./Zytopl.)	Anzahl	%
1 ; 1	9	1,1	1 ; 2	55	6,5
2 ; 1	4	0,5	2 ; 2	57	6,7
3 ; 1	6	0,7	3 ; 2	78	9,2
4 ; 1	9	1,1	4 ; 2	92	10,9
	28	3,4		282	33,3

1 ; 3	64	7,6	1 ; 4	15	1,8
2 ; 3	81	9,6	2 ; 4	47	5,6
3 ; 3	121	14,3	3 ; 4	26	3,1
4 ; 3	140	16,6	4 ; 4	42	5
	406	48,1		130	15,5

n = 846

Tabelle 19: Verteilung der morphologischen Gruppen nach Häufigkeit

In dieser Tabelle (Tabelle 19) ist dargestellt, wie unterschiedlich oft (Anzahl der Eizellen und Prozent) die verschiedenen morphologischen Gruppen vertreten waren.

Eizellen ohne Polkörper

Die Versuchseinheiten lieferten unterschiedlich viele Eizellen, die keinen Polkörper besaßen. Eine Übersicht darüber liefert Tabelle 19. Dabei fällt auf, dass in Versuch 30 von 84 morphologisch bestimmten Eizellen 49 Eizellen (58,3%) keinen Polkörper ausgebildet hatten. Zu berücksichtigen ist bei dieser Betrachtung, dass für die Versuchseinheiten jeweils zwei Mäuse zur Verfügung standen, mit Ausnahme der Versuchs 26 mit nur einer Maus.

Versuch-Nr.	Anzahl der Mäuse	morph. bestimmte Eizellen	Eizellen mit Polkörper	Eizellen ohne Polkörper	Anteil ohne Polkörper	FISH-Analyse
18	2	39	18	15	38,5%	7
19	2	66	28	31	47%	7
20	2	44	24	19	43,2%	3
21	2	32	16	14	43,8%	4
22	2	35	20	13	37,1%	2
24	2	60	27	27	45%	3
25	2	93	45	46	49,5%	6
26	1	54	30	15	27,8%	3
27	2	110	58	45	40,9%	9
30	2	84	23	49	58,3%	7
31	2	63	38	23	36,5%	8
33	2	93	42	42	45,2%	2
34	2	102	48	47	46,1%	8
36	2	63	32	30	47,6%	12
37	2	105	58	46	43,8%	17

Tabelle 19: Übersicht über die Verteilung von Eizellen mit und ohne Polkörper

3.6 Biometrie

Insgesamt wurden 223 von 1821 gewonnenen und 846 morphologisch bewerteten Eizellen aus 15 Versuchseinheiten biometrisch bestimmt. Angestrebt wurde eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen morphologischen Gruppen.

Die nachstehende Tabelle (Tabelle 19) zeigt einen Überblick über die Verteilung der biometrisch bestimmten morphologischen Gruppen (n=223). Die verschiedenen Morphologie-Gruppen wurden unterschiedlich häufig ausgemessen. Gruppen mit der Zytoplasmabewertung „1“ und „4“ wurden insgesamt seltener gefunden (Morphologie) und biometrisch bewertet als Gruppen mit einer Zytoplasmabewertung „2“ oder „3“ (Tabelle 18). Die Gruppen 3/3 und 4/3 (Polkörper/ Zytoplasma) waren relativ stark vertreten und wurden besonders während der ersten Versuchseinheiten häufiger biometrisch bestimmt. Die Gruppe 3/4 ist in den Messungen nicht enthalten, da zum Zeitpunkt der biometrischen Messungen keine Eizelle dieser Gruppe vorlag.

Polk.; Zytopl.	V.18	V.19	V.20	V.21	V.22	V.24	V.25	V.26	V.27	V.30	V.31	V.33	V.34	V.36	V.37	
1 ; 1							2				1					3
1 ; 2	1	3	2	2	1	2	4	3			3	1	2			24
1 ; 3		1	1	1	1	4		1	6	3	1	3	3	1		26
1 ; 4						1			1					1		3
2 ; 1												1				1
2 ; 2	1	2	2		1					1				2	1	10
2 ; 3	1				1				1		3		3	1	7	17
2 ; 4			1												3	4
3 ; 1															1	1
3 ; 2	1	7	1		1							1		5	1	17
3 ; 3	6	6	6	2	3					3				1	8	35
3 ; 4																0
4 ; 1								1				1		1		3
4 ; 2	3	2	2	1		1		3	3	1	3	5	2			26
4 ; 3	2	2	2	4	2	2	4	2	5	2	7	1	7	5		47
4 ; 4		1		1		1	2		1							6
gesamt	15	24	17	11	10	11	12	10	17	10	18	13	17	17	21	223

Tabelle 21: Anzahl morphologischer Gruppen mit biometrischer Bestimmung pro Versuch

Tabelle 21 gibt an, wie oft pro Versuchseinheit die verschiedenen morphologischen Gruppen auftraten.

Nachfolgend soll gezeigt werden, welche Größenunterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen im Hinblick auf Polkörper, Perivitellinen Raum, die Zytoplasmamenge, Dicke der Zona Pellucida und den Gesamtdurchmesser der Eizelle auftraten.

a) **Polkörper:** Die Eizelle mit dem kleinsten Polkörper (PK) entstammte der Gruppe 4/2 und hatte einen Durchmesser von $4,9\mu\text{m}$, den größten Polkörper lieferte eine Eizelle aus der morphologischen Gruppe 3/3 mit einem Durchmesser von $37,1\mu\text{m}$. Im Durchschnitt hatten die Polkörper einen Durchmesser von $17,03\mu\text{m}$ (Diagramm 11 und 12). Der Median liegt bei $14,6\mu\text{m}$.

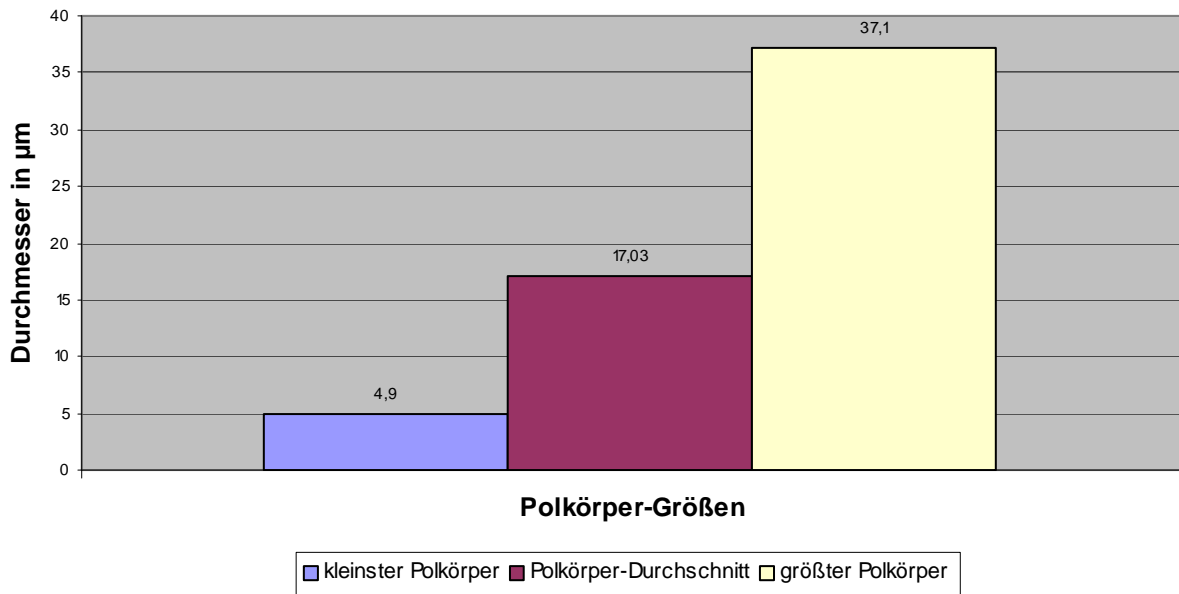


Diagramm 11: Darstellung des kleinsten, größten und des Durchschnitts-Polkörpers

Diagramm 11 stellt den kleinsten, größten und den durchschnittlichen Polkörper graphisch dar.

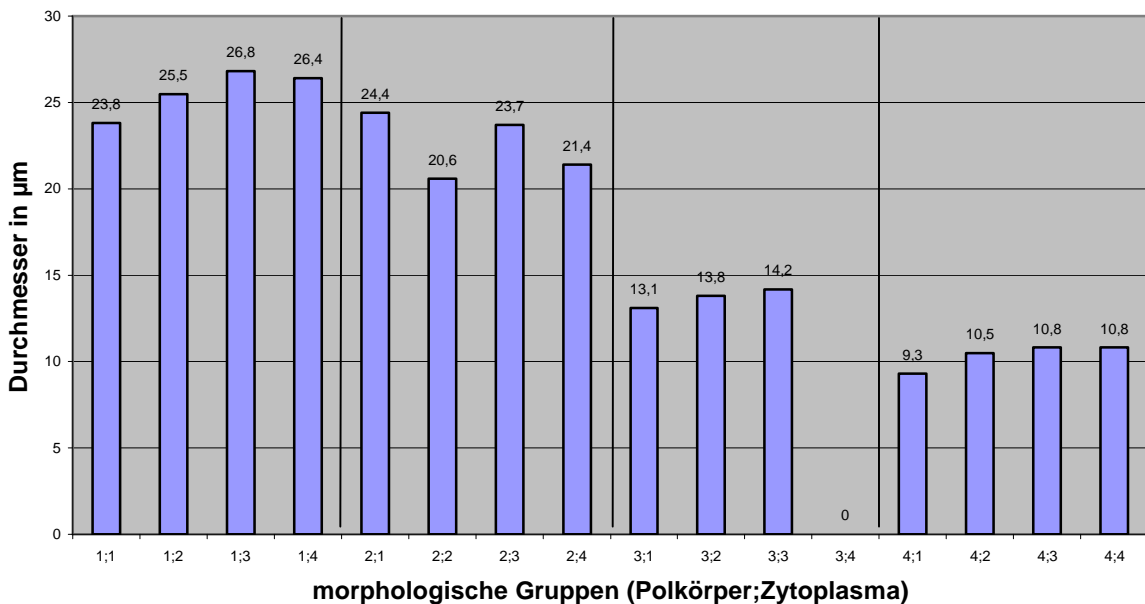


Diagramm 12: Verteilung der Polkörpergrößen auf die verschiedenen morphologischen Gruppen

Das Diagramm 12 zeigt die unterschiedlichen Polkörper-Durchschnittsgrößen.

b) Perivitelliner Raum: Den kleinsten Perivitellinen Raum (PVR) zeigte eine Eizelle aus der Gruppe 1/3 mit $0,9\mu\text{m}$. Der größte Perivitelline Raum wurde ebenfalls bei einer Eizelle dieser Gruppe gefunden und maß $17,7\mu\text{m}$. Im Durchschnitt wies der Perivitelline Raum eine Größe von $7,02\mu\text{m}$ auf (Diagramm 13 und 14), Median $6,6\mu\text{m}$.

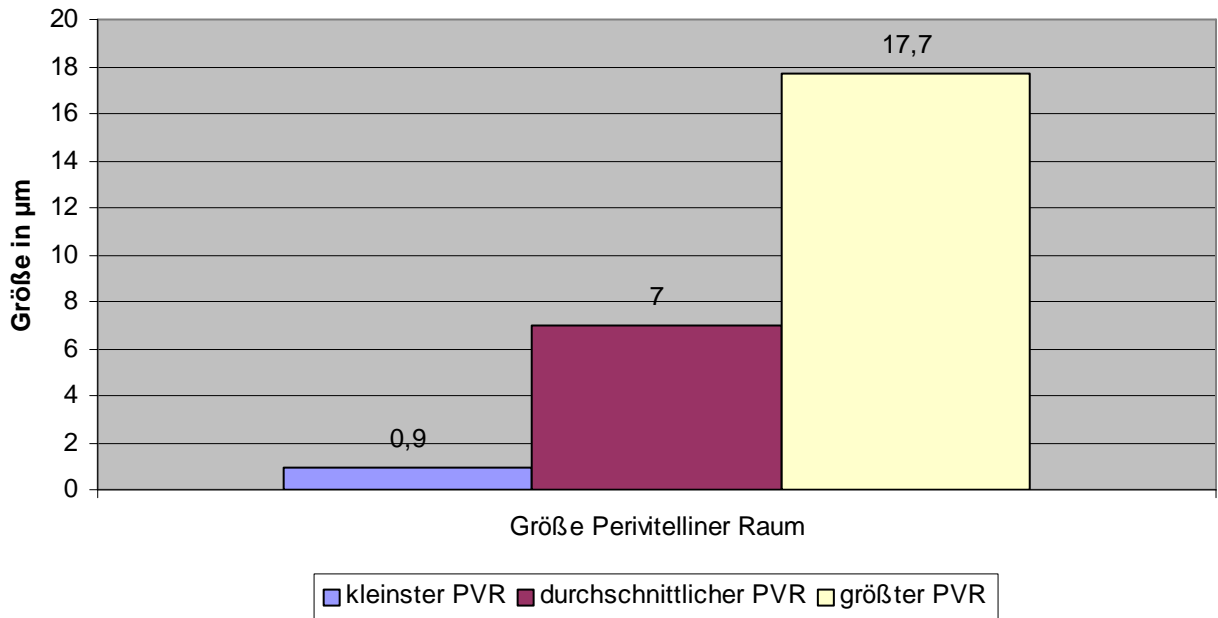


Diagramm 13: kleinster, größter und durchschnittlicher Perivitelline Raum

Das Diagramm 13 zeigt den jeweils kleinsten, größten und durchschnittlich großen Perivitellinen Raum.

Verteilung durchschnittlicher Perivitelline Raum

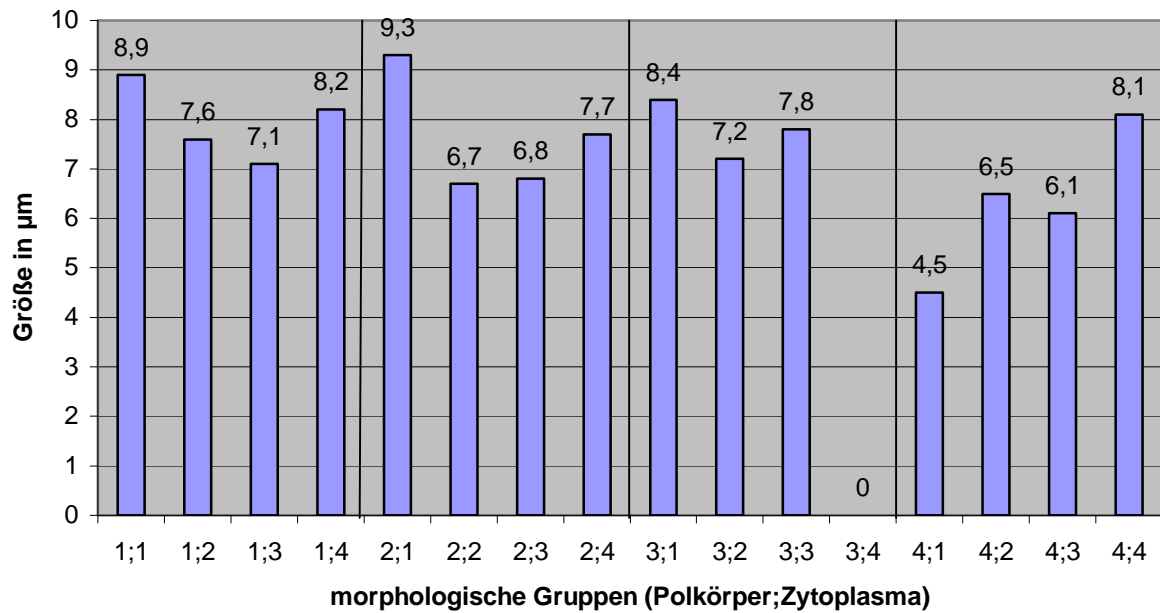


Diagramm 14: Verteilung durchschnittlicher Perivitelliner Raum auf morphologische Gruppen

In diesem Diagramm ist die Verteilung des durchschnittlichen Perivitellinen Raumes auf die jeweiligen morphologischen Gruppen dargestellt.

c) **Zona Pellucida:** Eine dünne Zona Pellucida (ZP) mit einer Dicke von $5,3\mu\text{m}$ fand sich in der Gruppe 2/2. Die dickste Zona Pellucida zeigte sich bei einer Eizelle der Gruppe 4/2 mit einer Dicke von $11,6\mu\text{m}$. Im Mittel war die Zona Pellucida $7,543\mu\text{m}$ dick (Diagramm 15 und 16). Der Median beträgt $7,5\mu\text{m}$.

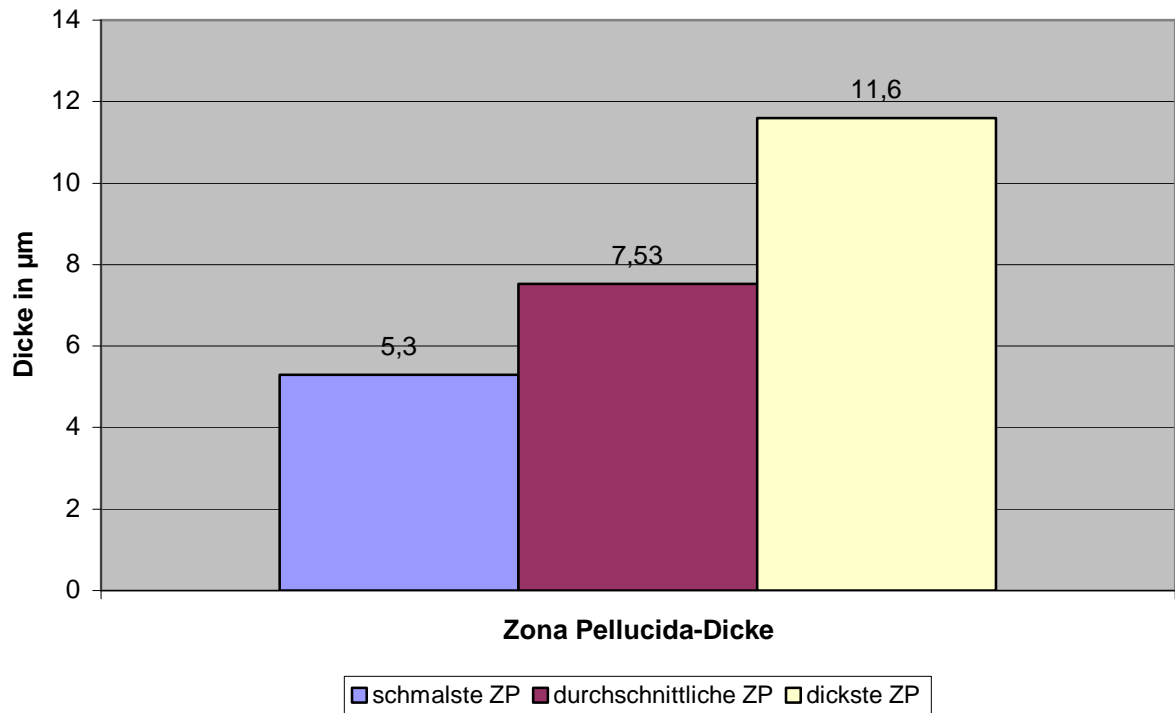


Diagramm 15: schmalste, dickste und durchschnittliche Zona Pellucida

Dargestellt sind in Diagramm 15 die jeweils schmalste, dickste und die durchschnittliche Zona Pellucida.

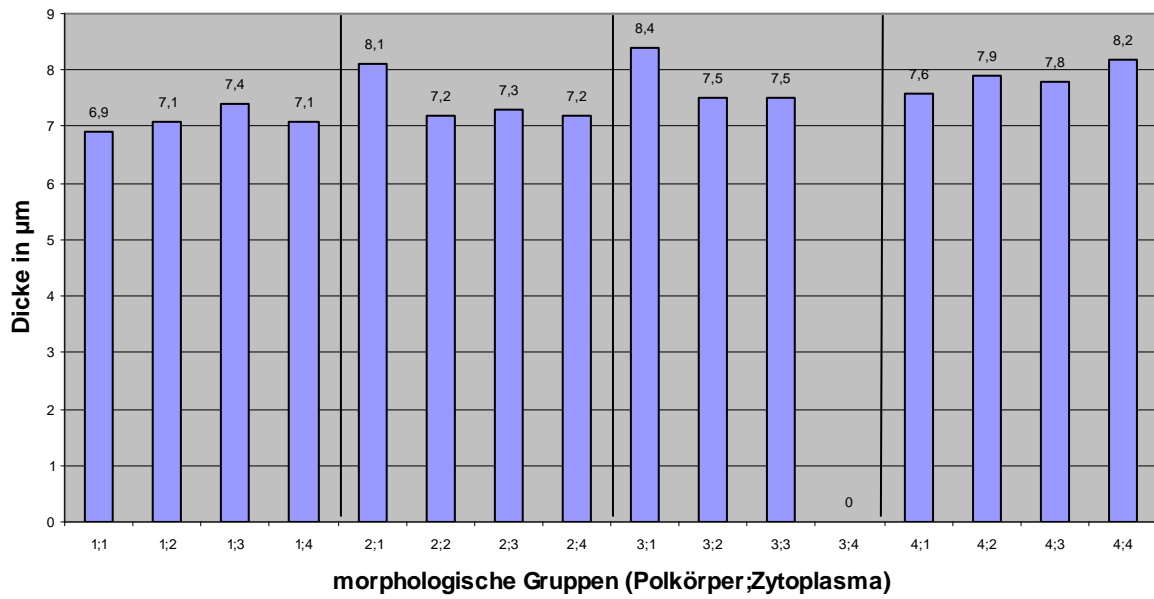


Diagramm 16: Verteilung durchschnittliche Zona Pellucida-Dicke auf morphologische Gruppen

In Diagramm 16 präsentieren sich die durchschnittlichen Zona Pellucida-Größen, jeweils bezogen auf die verschiedenen morphologischen Gruppen.

d) Zytoplasma: Das Zytoplasma maß als geringsten Durchmesser 63,1µm bei einer Eizelle der Gruppe 1/3. Der größte Wert fand sich ebenfalls in der Gruppe 1/3 mit 97µm. Durchschnittlich hatte das Zytoplasma einen Durchmesser von 74,21µm (Diagramm 17 und 18).

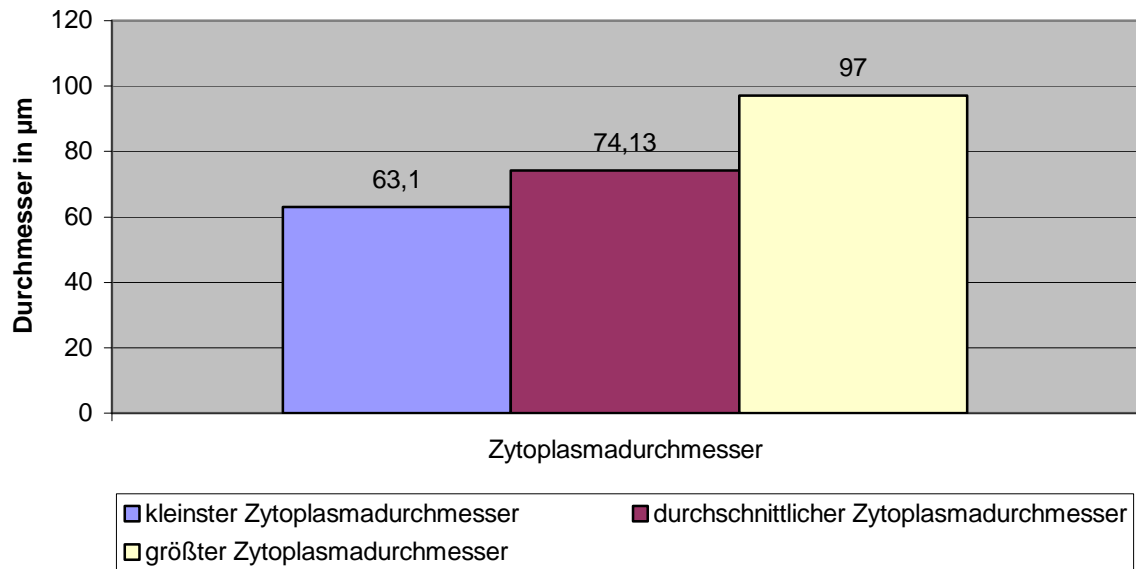


Diagramm 17: kleinster, größter und durchschnittlicher Zytoplasmadurchmesser

In diesem Diagramm (Diagramm 17) sind der jeweils kleinste, größte und durchschnittliche Zytoplasmadurchmesser graphisch wiedergegeben.

Verteilung durchschnittlicher Zytoplasmadurchmesser

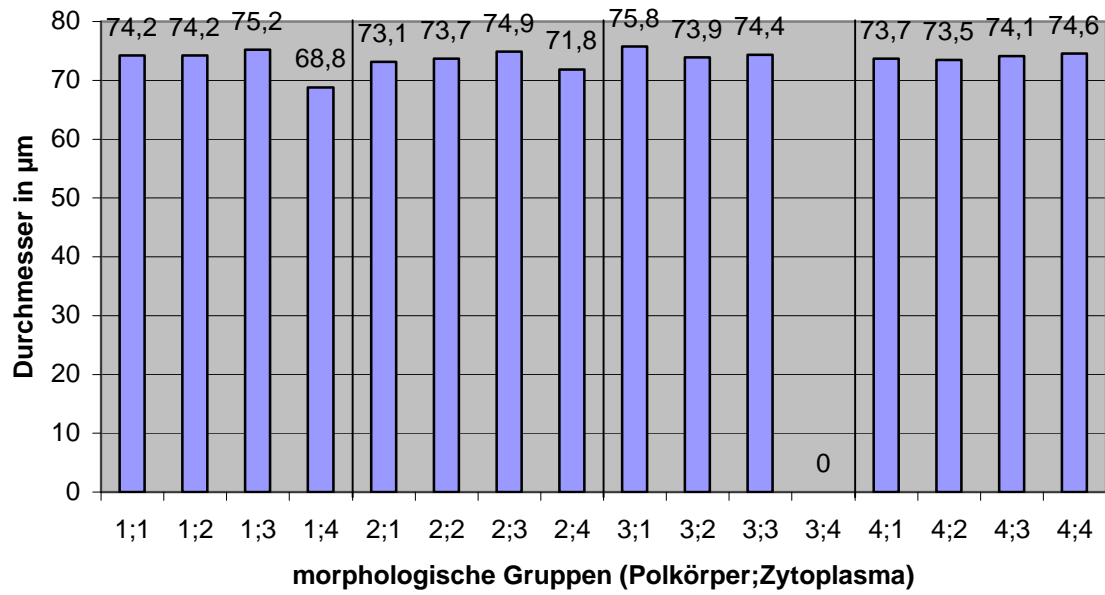


Diagramm 18: Verteilung durchschnittlicher Zytoplasmadurchmesser auf morphologische Gruppen

Das Diagramm 18 gibt die jeweiligen durchschnittlichen Zytoplasmadurchmesser wieder.

e) **Gesamtdurchmesser der Eizelle:** Die insgesamt kleinste Eizelle lieferte die Gruppe 2/4 mit einem Durchmesser von 79,4µm. Die größte Eizelle war 116,3µm groß und entstammte der Gruppe 1/3. Im Mittel waren die Eizellen 100,32µm groß (Diagramm 19 und 20).

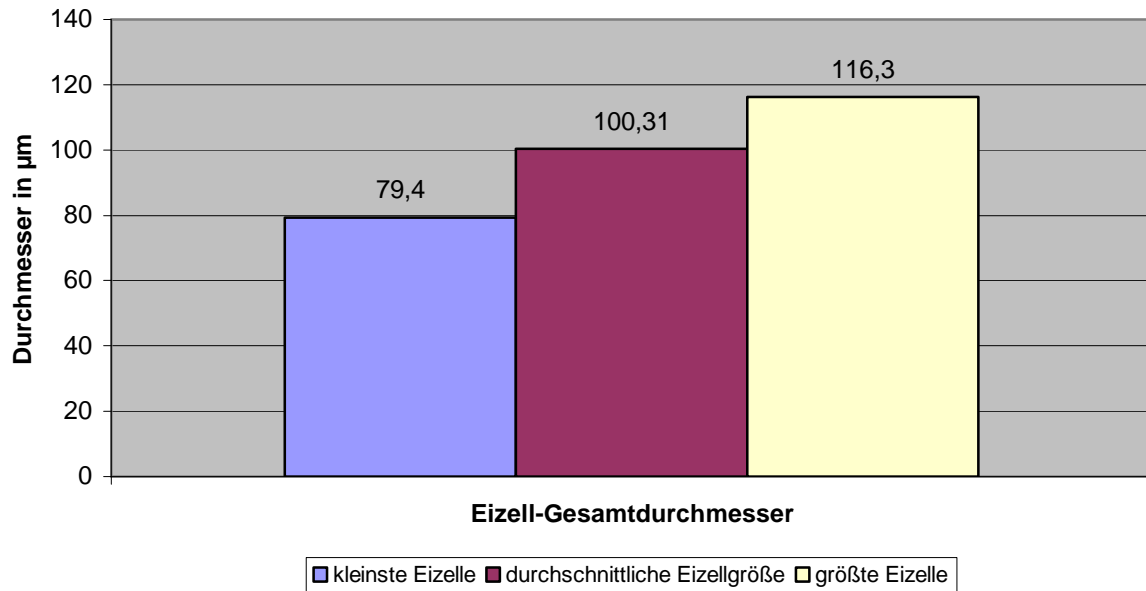


Diagramm 19: kleinster, größter und durchschnittlicher Eizell-Durchmesser

In diesem Diagramm (Diagramm 19) sind der kleinste, größte und der durchschnittliche Eizell-Gesamtdurchmesser graphisch wiedergegeben.

Verteilung durchschnittlicher Eizell-Gesamtdurchmesser

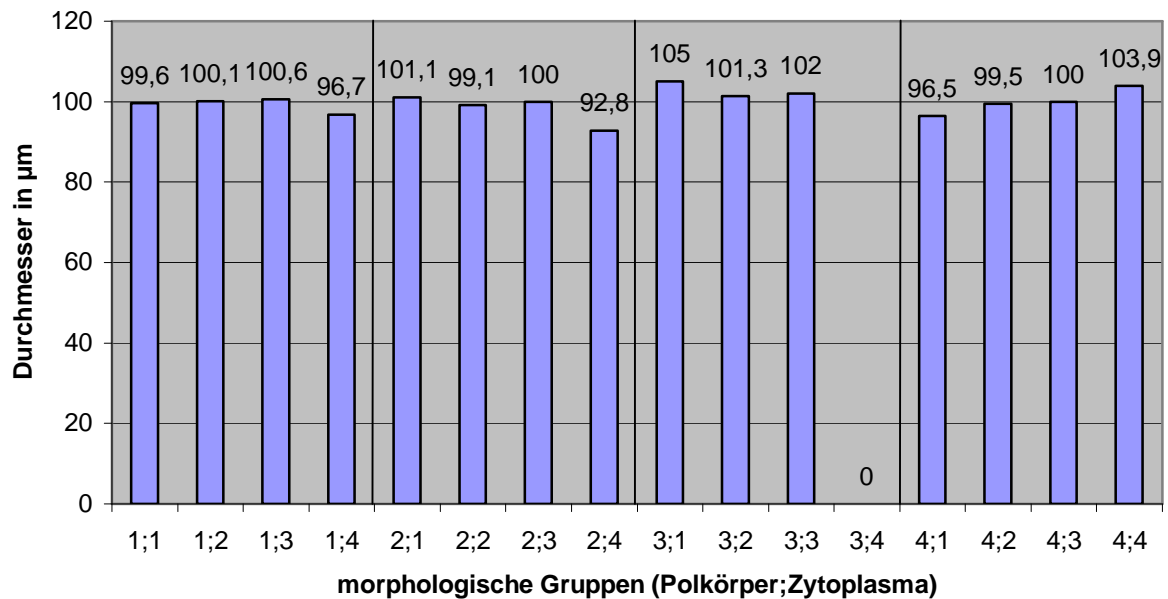


Diagramm 20: Verteilung durchschnittlicher Eizell-Gesamtdurchmesser auf morphologische Gruppen

Das Diagramm 20 zeigt die durchschnittlichen Eizell-Durchmesser, verteilt auf die verschiedenen morphologischen Gruppen.

3.7 Oogramm

Erstellt werden soll an dieser Stelle ein Oogramm in Anlehnung an das Spermiogramm, welches biometrisch „normale“ Eizellen von „nicht normalen“ Eizellen unterscheidet. Definiert werden die „Normalparameter“ als diejenigen Eizellmaße eines jedes Eizellpools (Polkörper, Perivitelliner Raum, Zona Pellucida, Zytoplasma und Eizellgesamtdurchmesser), welche die mittleren Zweidrittel bilden (jeweils eine Standardabweichung ober- und unterhalb des Mittelwertes).

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 22) gibt den jeweiligen Mittelwert, Median, die Standardabweichung sowie die „Normalwerte“ (in µm) an.

	Mittelwert (μm)	Median (μm)	Standard- Abweichung (μm)	"Normal- Parameter" (μm)
Polkörper	17,03	14,6	7,45	9,58 - 24,48
Perivitelliner Raum	7	6,6	2,47	4,53 - 9,47
Zona Pellucida	7,53	7,5	0,81	6,72 - 8,34
Zytoplasma	74,13	74,1	2,9	71,23 - 77,03
Gesamteizelle	100,31	100,3	4,44	95,87 - 104,75

Tabelle 22: Normalparameter

Tabelle 21 beschreibt jeweils den Mittelwert, Median, die Standardabweichung sowie die „Normalwerte“ (in μm) der Parameter Polkörper, Perivitelliner Raum, Zona Pellucida, Zytoplasma und Gesamteizelle.

Das Oogramm unseres untersuchten Mäusestammes legt „normale“ Eizellen fest. Diese werden anhand ihrer Biometrie festgemacht. „Normale“ Eizellen besitzen einen Gesamtdurchmesser von 95,87 μm bis 104,75 μm . Der Polkörperdurchmesser bewegt sich zwischen 9,58 μm und 24,28 μm . „Normale“ Eizelle haben eine Zona Pellucida-Dicke von 6,72 μm bis 8,34 μm und einen 4,53 μm bis 9,47 μm breiten Perivitellinen Raum. Der Zytoplasmadurchmesser beträgt 71,23 μm bis 77,03 μm .

In unserem Fall stellt sich die Verteilung der „normalen Eizellen“, gemessen an insgesamt 223 biometrisch bestimmten Eizellen, im Einzelnen wie folgt dar:

„normaler Polkörper“:	130 Eizellen (58,3%)
„normaler Perivitelliner Raum“:	158 Eizellen (70,9%)
„normale Zona Pellucida“:	165 Eizellen (74%)
„normales Zytoplasma“:	189 Eizellen (84,8%)
„normaler Eizellgesamtdurchmesser“:	172 Eizellen (77,1%)

59 Eizellen (26,5%) wiesen in allen fünf biometrischen Parametern „normale“ Messwerte auf.

Eine Zuordnung zu den entsprechenden Versuchseinheiten bzw. Mäusen liefert die Übersicht in Tabelle 23:

Versuch-Nr.	Anzahl Maus	Biometrie gesamt	"normale" Eizellen
18	2	15	8
19	2	24	9
20	2	17	2
21	2	11	3
22	2	10	6
24	2	11	1
25	2	12	1
26	1	10	3
27	2	17	2
30	2	10	0
31	2	18	10
33	2	13	3
34	2	17	3
36	2	17	4
37	2	21	4
15	29	223	59

Tabelle 23: Verteilung der biometrisch „normalen“ Eizellen

3.8 Korrelation von Biometrie und Genom

Die Prüfung der Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen Eizellbiometrie und Genom besteht, wurde mittels eines t-Tests für unabhängige Stichproben vorgenommen und auf einem Signifikanz-Niveau von 5% geprüft ($p \leq 0.05$). Hierbei wurden die Anomalien NDJ+, ubpd+, ubpd- sowie bp zusammengefasst, weil

- in 2 Gruppen die Fallzahlen mit $n = 2$ sehr gering ausgeprägt waren und
- die statistische Power mit einer entsprechend zusammengefassten Gruppe steigt.

Der statistische Test wurde ungerichtet vorgenommen, denn es bestanden keine Hypothesen darüber, in welcher der beiden dichotomisierten Genom-Gruppen („normal“ vs. „nicht-normal“) die untersuchten Variablen eine größere bzw. geringere Ausprägung aufweisen würden. Um die Angemessenheit des t-Tests zu bewerten, wurde die Prüfung auf Varianzenhomogenität bezüglich der untersuchten fünf Variablen Polkörpergröße, Perivitelliner Raum, Zona Pellucida-Dicke, Zytoplasmavolumen und Eizellgesamtdurchmesser vorgenommen.

Dichotome Genetik		n	Mittelwert (µm)	Minimum / Maximum (µm)	Standard-Abweichung (µm)	t-Test (ungerichtet Signifikanz)	Signifikanz
Polkörper	Normal	60	17,25	6,4 / 31,5	7,45	0,067	schwach
	nicht normal	19	20,88	4,9 / 29,4			
Perivitelliner Raum	Normal	60	6,93	2,6 / 17,7	2,47	0,962	nein
	nicht normal	19	6,9	0,9 / 12,5			
Zona Pellucida	Normal	60	7,55	5,3 / 9,3	0,81	0,305	nein
	nicht normal	19	7,35	6,1 / 8,7			
Zytoplasma	Normal	60	74,2	69,5 / 79	2,9	0,569	nein
	nicht normal	19	74,6	67 / 86,4			
Eizellgesamt-Durchmesser	Normal	60	100,92	92,1 / 116,3	4,44	0,06	schwach
	nicht normal	19	98,45	79,4 / 109,9			

Tabelle 24: Beschreibende Statistik (Genetik normal vs. nicht normal)

Tabelle 24 beschreibt die Statistik („normale“ Genetik vs. „nicht normal“).

Es wird deutlich, dass für die Variablen Polkörpergröße (PK) und Eizellgesamtdurchmesser (EZ) nennenswerte Unterschiede bestehen.

Im Ergebnismuster bestätigt sich, was die reine Betrachtung der Mittelwerte in beiden Genetik-Gruppen nahe legt:

Der Polkörper ist in der Gruppe der genetisch nicht normalen größer ausgeprägt; allerdings nicht signifikant ($t = -1,861$, $p < 0,067$). Ebenfalls unterschiedlich sind die Mittelwertsausprägungen für die Variable Größe der Oocyten ($t = 1,906$, $p < 0,060$). Allerdings sind auch für diese Variable die Unterschiede statistisch nicht signifikant. In gleiche Richtung weisen die Ergebnisse auch, wenn man zum Testen auf Unterschiede zwischen den Gruppen einen non-parametrischen Test heranzieht (den Mann-Whitney U Test, Mittelwertsvergleich).

Wir definieren die Signifikanzen der Variablen Polkörper und Eizellgesamtdurchmesser aufgrund ihrer Signifikanztendenz als schwach signifikant.

3.9 Korrelation von „normaler“ und „nicht normaler“ Biometrie und Genom

Hier sollte ein Zusammenhang herausgestellt werden zwischen biometrisch „normalen“ Eizellen und ihrem dazugehörigen Genom, sowie zwischen biometrisch „nicht normalen“ Eizellen und dem Genom. Berücksichtigt wurden nur die Eizellen, bei denen alle fünf biometrischen Parameter „normal“ sind. Als „normale“ Chromosomen 16 werden diejenigen Chromosomen definiert, welche weder Non-Disjunction noch balancierte oder unbalancierte Prädivisionen aufweisen.

Die Tabellen 25 und 26 zeigen eine Übersicht über die genetische Analyse biometrisch „normaler“ und „nicht normaler“ Eizellen.

	Anzahl der Eizellen	gesamt %	auswertbar %
"normale" Biometrie	59		
"normale" Biometrie + Analyse Chr. 16	23	100	
auswertbares Chromosom 16	19		100
normales Chromosom 16	18	78,3	94,7
abnormales Chromosom 16	1	4,3	5,3
Non Disjunction +	0	0	0
Non Disjunction -	0	0	0
balancierte Prädivision +	0	0	0
nicht balancierte Prädivision +	1	4,3	5,3
nicht balancierte Prädivision -	0	0	0
nicht auswertbares Chromosom 16	4	17,4	

Tabelle 25: Korrelation „normale“ Biometrie und Genom

In Tabelle 25 wird die „normale“ Biometrie mit dem Genom korreliert.

	Anzahl der Eizellen	gesamt %	auswertbar %
"nicht normale" Biometrie	164		
"nicht normale" Biometrie + Analyse Chr. 16	75	100	
auswertbares Chromosom 16	60		100
normales Chromosom 16	42	56	70
abnormales Chromosom 16	18	24	30
Non Disjunction +	2	2,7	3,3
Non Disjunction -	0	0	0
balancierte Prädivision +	8	10,7	13,3
nicht balancierte Prädivision +	6	8	10
nicht balancierte Prädivision -	2	2,7	3,3
nicht auswertbares Chromosom 16	15	20	

Tabelle 26: Korrelation „nicht normale“ Biometrie und Genom

In Tabelle 26 werden „nicht normale“ Biometrie und Genom korreliert.

Die statistische Auswertung ergab einen schwach signifikanten Zusammenhang (Korrelation = 0,194, Signifikanz $p = 0,055$) zwischen biometrisch „normalen“ Eizellen und der Wahrscheinlichkeit eines normalen Chromosom 16 (Tabelle 27). Dieser Zusammenhang ist zwar moderat, jedoch nachweisbar.

	normale Biometrie	nicht normale Biometrie	Korrelation normale Biometrie / normales Chr. 16	Signifikanz
normales Chromosom 16	18	42		
nicht normales Chromosom 16	1	18		
keine Auswertbarkeit	4	15		
gesamt	23	75	0,194	0,055

Tabelle 27: Korrelation von normaler Biometrie und normalem Chromosom 16

In Tabelle 27 erfolgte die Korrelation von normaler Biometrie und normalem Chromosom 16.

4. Diskussion

Chromosomenveränderungen stellen einen wichtigen Faktor in der Fortpflanzungsmedizin dar. Sie sind der Grund für eine hohe Rate an ungewollter Kinderlosigkeit. Dabei stellt vor allem die mütterliche Meiose einen wichtigen biologischen Prozess dar.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem Chromosom 16 der Maus. Dieses Chromosom enthält Sequenz-Abschnitte, die dem menschlichen Chromosom 21 homolog sind. Da das Down- Syndrom (Trisomie auf Chromosom 21) beim Menschen die häufigste durch Chromosomenstörung verursachte Erkrankung darstellt, gilt dem Chromosom 16 der Maus unser besonderes Interesse.

Spontane Fehlgeburten nach assistierter Fertilisation treten mit einer Häufigkeit von etwa 14% auf (Buckett et al., 2007) auf (15,7% nach IVF und 12,6% nach ICSI). Es kommt schätzungsweise in bis zu 50% aller Befruchtungen zu keiner Schwangerschaft und der Fetus wird mit der nächsten Menstruation wieder ausgeschieden (Haag et al., 2003).

Um beim Menschen die Häufigkeit einer Fehlgeburt durch Aneuploidien nach assistierter Fertilisation zu senken, wird im Mausmodell ein Zusammenhang hergestellt zwischen der Biometrie der zu befruchtenden und implantierenden Eizelle und ihrem dazugehörigen Chromosom 16. Nicht berücksichtigt werden eine Verringerung der Schwangerschaftsrate durch Fehler während der Implantation oder der Durchführung einer künstlichen Befruchtung.

Das Ziel der Studie ist es, eine Übertragbarkeit herzustellen zwischen Untersuchungen an der Maus und dem Menschen. Es soll damit eine einfache und verlässliche Methode entwickelt werden, durch Vorauswahl unbefruchteter Eizellen größere Schwangerschaftsraten nach IVF oder ICSI zu erzielen. Mikroskopisch soll eine Aussage gemacht werden können über die Qualität der Eizelle.

Die Methoden der assistierten Fertilisation stellen invasive Maßnahmen dar. Dies gilt sowohl für den Eingriff an der Frau (hormonelle Stimulation, Punktion der Eizellen und Implantation), als auch für die Manipulation der Eizelle (Injektion von Spermien bei ICSI, Inkubation in vivo). Es ist daher wichtig, im Vorfeld zu ermitteln, mit welcher Wahrscheinlichkeit von einer Schwangerschaft (und deren Vollendung) ausgegangen werden kann. Es müssen sowohl mögliche Risiken einer künstlichen Befruchtung, als auch die Häufigkeit des Spontanauftretens von Aborten, chromosomaler Anomalien oder angeborener Störungen mit einbezogen werden.

4.1 Effizienz

Hormonelle Stimulation

Während der ersten 14 Versuchseinheiten wurden die Mäuseweibchen mit unterschiedlichen PMSG- und HCG-Dosen stimuliert (5IU / 200µl, 7,5IU / 300µl und 10IU / 400µl NaCl 0,9%). Die durchschnittliche Eizellmenge, die bei diesen Dosierungen gewonnen werden konnte, lag bei 1,25 Eizellen (5IU / 200µl NaCl 0,9%; 2 Versuchseinheiten), 2,5 Eizellen (7,5IU / 300µl NaCl 0,9%; 1 Versuchseinheit) und 10,9 Eizellen (10IU / 400µl NaCl 0,9%; 11 Versuchseinheiten) pro Maus.

Von Versuchseinheit 15 an wurde eine PMSG- und HCG- Dosierung von jeweils 10IU / 200µl NaCl 0,9% gewählt. Die Eizellausbeute konnte so auf 33,8 Eizellen pro Maus gesteigert werden (23 Versuchseinheiten). Der zeitliche Abstand zwischen PMSG- und HCG-Injektion blieb jeweils konstant.

Eine Übersicht über in der Literatur berichtete Stimulierungsmethoden liefert Tabelle 28:

Autor, Erscheinungsjahr	Alter der Maus (Tage)	PMSG (IU)	HCG (IU)	zeitlicher Abstand PMSG / HCG	Eizellmenge pro Maus
Ny, 1995	25	1,6	5	48	8,3
Klein, 1995	keine Angabe	5	5	keine Angabe	keine Angabe
Leonardsson, 1995	25	1,5	5	48	10,4
unsere Ergebnisse ab Versuch 19	63 - 102	10	10	48	33,8

Tabelle 28: Stimulierungsmethoden

Stimuliert wurde jeweils mit PMSG und HCG, die Konzentrationen unterschieden sich jedoch von unseren. Die pro Maus erzielte Eizellmenge war in unserer Arbeit deutlich höher als die in der Literatur gefundene.

Im Vergleich zu unserer Methode stimulierten Leonardsson et al. (1995) 25 Tage alte Mäuse mit 1,5IU PMSG sowie 48 Stunden später mit 5IU HCG. Dafür wurden Mäuse mit defizienten Plasminogenaktivatorgenen verwendet. Die Arbeitsgruppe um Ny et al. (1995) stimulierten ebenfalls 25 Tage alte Mäuse mit fehlerhaften Plasminogenaktivatorgenen. Sie verwendeten 1,6IU PMSG und 48 Stunden später 5IU HCG. Auch hier sollte der Einfluss des Plasminogen-Aktivator-Systems auf die Ovulationseffizienz herausgearbeitet werden.

Klein et al. (1995) behandelten Mäuse des Stammes C57BL/6J mit jeweils 5IU PMSG und HCG und konnten damit die größtmögliche Eizellmenge erzielen.

Schlussfolgerung: Stimulierungsmethoden mit dem von uns verwendeten Mäusestamm sind in der Literatur nicht erwähnt. Daher ist ein direkter Vergleich unserer Untersuchungsergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen nicht möglich. Dennoch können wir behaupten, die von uns gewählte Methode zur hormonellen Stimulation der Mäuse sei effizient, denn es konnte eine gute Eizellausbeute erzielt werden. Dabei war entscheidend, sowohl eine ausreichende Menge des jeweiligen Hormons, als auch eine möglichst geringe Gesamtmenge (in NaCl 0,9% gelöst) zu applizieren. Die Eizellmenge nicht hormonell stimulierter Mäuse variiert zwischen acht und zwölf Eizellen pro Maus.

Eizellfixierung

Bereits 1966 wurden von Tarkowski Polkörper fixiert. Diese wurden zunächst für 10 bis 15 Minuten in einer hypotonen Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie auf einen gereinigten Objektträger übertragen und mit 20µl Fixierungslösung (Verhältnis Methanol/Eisessig 3:1) bedeckt. Dadurch öffnete sich der Polkörper und die Chromosomen wurden frei. Unter dem Mikroskop wurde die Position der Chromosomen markiert.

Eine weitere Fixierungsmethode stellt die Gradual Fixation-Air-Drying (GF-AD)-Technik nach Mikamo und Kamiguchi (1986) dar. Hierbei wurde der Polkörper ebenfalls zunächst in hypotoner Lösung inkubiert und anschließend in die erste Fixierungslösung (Verhältnis Methanol/Eisessig/Wasser 5:1:4) gegeben und fünf Minuten inkubiert. Danach folgte die Übertragung auf den gereinigten Objektträger und die zügige Bedeckung mit einer zweiten Fixierungslösung (Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1). Anschließend wurde der Objektträger für fünf Minuten in ein Glasgefäß mit der zweiten Fixierungslösung gegeben und dann für eine weitere Minute in eine dritte Fixierungslösung (Methanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 3:3:1), anschließend getrocknet.

Schlussfolgerung: Unsere Methode zur Fixierung von Eizellen stellt eine effektive und vereinfachte Form des Verfahrens nach Kamiguchi und Mikamo dar. Es werden dabei nur zwei verschiedene Fixativa benötigt und die Fixierungsdauer konnte verkürzt werden. Wir optimierten die Methode dadurch, dass die gereinigten Objektträger bereits im Vorfeld mit Hilfe eines Diamantstiftes eine Markierung erhielten, auf die die Eizelle gegeben wurde. Somit wurde das Wiederfinden der freiwerdenden Chromosomen erleichtert.

4.2 Qualitative Morphologie

Die morphologische Einteilung von Eizellen sowie die prognostische Aussagefähigkeit im Hinblick auf Fertilisationsrate liefern Anlass zu kontroverser Diskussion. Nicht zuletzt die sehr subjektive Bewertung der Eizellmorphologie macht die Beurteilung schwierig. Aber auch verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation von Eizellmorphologie und Fertilisations- bzw. Schwangerschaftsrate. Insgesamt existieren unterschiedliche Kriterien, Eizellen nach morphologischen Gesichtspunkten einzuteilen. Es ist festgestellt worden, dass menschliche Metaphase II-Oozyten guter Qualität folgende Eigenschaften haben sollen: ein klares, mäßig granuliertes Zytoplasma, einen schmalen Perivitellinen Raum, einen intakten ersten Polkörper und eine farblose Zona Pellucida (De Sutter et al., Xia, 1997; Ebner et al., 2000). Grundsätzlich können morphologische Auffälligkeiten in zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich in zytoplasmatische und extrazytoplasmatische (Ebner et al., 2001b). Perspektivisch ist eine frühe Identifikation prognostischer Parameter wichtig, um diejenigen Oozyten mit der größten Implantationswahrscheinlichkeit zu identifizieren.

4.2.1 Morphologische Einteilung

Die Einteilung der Eizellen nach morphologischen Gesichtspunkten erfolgte abhängig vom Autor sehr unterschiedlich. Einen kurzen chronologischen Überblick über die verschiedenen Beschreibungsmöglichkeiten stellt die nachfolgende Tabelle (Tabelle 29) dar:

Autor, Erscheinungsjahr	Morphologie	morphologische Einteilung
Veeck, 1991	Zytoplasma	3 Gruppen
Serhal, 1997	Zytoplasma	3 Gruppen
Xia, 1997	Polkörper, Perivitelliner Raum, Zytoplasma	4 Gruppen
Balaban, 1998	Polkörper, Perivitelliner Raum, Zytoplasma, Zona Pellucida	5 Gruppen
Ebner, 1999	Polkörper	5 Gruppen
Mikkelsen, 2001	Polkörper, Perivitelliner Raum, Zytoplasma	4 Gruppen
Ebner, 2002	Polkörper, Perivitelliner Raum, Zytoplasma	4 Gruppen
Ciotti, 2004	Polkörper	5 Gruppen
unsere Untersuchungen	Polkörper, Perivitelliner Raum, Zytoplasma, Zona Pellucida, Eizellgesamtdurchmesser	4 Gruppen

Tabelle 29: morphologische Einteilung (chronologisch)

Tabelle 29 stellt unterschiedliche Möglichkeiten dar, Eizellen anhand morphologischer Gesichtspunkte zu beschreiben.

Polkörperbeschreibung

So beschrieben beispielsweise Ebner et al. (1999) nur den Polkörper und bildeten damit fünf Gruppen. Parameter wie Zytoplasma, Perivitelliner Raum, Zona Pellucida oder Eizellgesamtdurchmesser blieben unberücksichtigt. Gruppe 1: runder oder ovaler intakter Polkörper mit glatter Oberfläche. Gruppe 2: wie Gruppe 1 mit rauer Oberfläche. Gruppe 3: mehr als zwei Fragmente. Gruppe 4: zweigeteilter Polkörper. Gruppe 5: riesiger Polkörper im vergrößerten Perivitellinen Raum.

Auch Ciotti et al. (2004) beschränkten sich auf den Polkörper, um anschließend das Verhältnis von Polkörpermorphologie, Fertilisationsrate, Embryoqualität, Schwangerschafts- und Implantationsrate zu analysieren. Auch in dieser Arbeit wurde der Polkörper in fünf Gruppen eingeteilt (Ebner et al., 1999). Anschließend wurde eine vereinfachte Klassifikation gewählt, indem Grad 1 und 2 als intakte Polkörper und Grad 3 und 4 als fragmentierte Polkörper zusammengefasst wurden (Ebner et al., 2002). Die unterschiedlichen morphologischen Grade werden hier auf eine unterschiedliche Kernreifungsdauer zurück geführt.

Schlussfolgerung: Unsere Methode, die Polkörpermorphologie zu beschreiben, ist in der Literatur nicht zu finden. Wir beschränkten uns auf die Beschreibung intakter, also nicht fragmentierter Polkörper, wo hingegen sich die Beschreibung anderer Arbeiten auch mit fragmentierten Polkörpern befasst. Unsere Methode stellt eine Vereinfachung der Beschreibung und Beurteilung von Eizellen dar.

Zytoplasmabeschreibung

Anders hingegen Serhal et al. (1997), welche die gewonnenen menschlichen Metaphase II-Oozyten nur anhand ihres Zytoplasmas beurteilten (Veeck, 1991) und in drei Gruppen einteilten. 1. Eizellen mit normaler Zytoplasma-Morphologie (klares Zytoplasma mit uniformer Struktur und homogener, feiner Granulation), 2. Eizellen mit ausgeprägten zytoplasmatischen Granulationen (homogen im gesamten Zytoplasma oder konzentriert mittig mit umgebender Aufhellung) und 3. Oozyten mit zytoplasmatischen Einschlüssen (Vakuolen unterschiedlichen Durchmessers). Die am häufigsten zu findenden Zytoplasma-Auffälligkeiten stellen dabei Granulationen und intrazytoplasmatische Einschlüsse dar.

Schlussfolgerung: Über die morphologische Beurteilung des Zytoplasmas ist in der Literatur kaum berichtet worden. Die Arbeitsgruppe um Serhal (1997) teilte das Zytoplasma in drei Gruppen und nahm Bezug auf Granulationen und Einschlüsse. Wir dagegen beschrieben lediglich die farbliche Erscheinung (hell oder dunkel) sowie die Homogenität des Zytoplasmas, was wiederum die Beurteilung der Eizellen vereinfachen soll.

Beschreibung von Polkörper, Perivitellinem Raum und Zytoplasma

Ganz anders geht die Arbeitsgruppe um Xia (1997) mit der Beschreibung der Eizellen um. In dieser Arbeit werden die Parameter Polkörper, Perivitelliner Raum und Zytoplasma beschrieben. Die von Kumuluszellen befreiten menschlichen Eizellen (Metaphase II) wurden in vier morphologische Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: fragmentierter Polkörper und erweiterter Perivitelliner Raum. Gruppe 2: intakter Polkörper und erweiterter Perivitelliner Raum. 3. Gruppe: fragmentierter Polkörper und normaler Perivitelliner Raum. Gruppe 4: intakter Polkörper und normaler Perivitelliner Raum. Die Gruppen 3 und 4 wurden als „gute“ Eizellen und die Gruppen 1 und 2 als „schlechte“ Eizellen definiert. Detaillierte Größenangaben zu den morphologischen Parametern wurden in dieser Arbeit nicht gemacht.

Die morphologische Evaluation von Mikkelsen et al. (2001) wurde entsprechend der Einteilung nach Xia (1997) und Ebner et al. (2000) vorgenommen. Hierbei wurden vier Gruppen gebildet und folgende Parameter berücksichtigt: Eizellform, Farbe, Granulation und Zytoplasmahomogenität, Größe des Perivitellinen Raumes, Vorhandensein von Zellresten im Perivitellinen Raum und Vakuolen, Einschlüsse und Anormalitäten des ersten Polkörpers oder der Zona Pellucida.

In der Arbeit von Balaban et al. (1998) konnte ein übersichtliches und auch von uns favorisiertes Einteilungsschema (Beurteilung von Polkörper und Zytoplasma) wiedergefunden werden. Es wurden die Parameter Zytoplasma, Zona Pellucida, Perivitelliner Raum und Polkörper berücksichtigt. Anschließend fand eine Unterbringung in fünf Gruppen statt: 1. normale Eizellmorphologie, 2. Eizellen mit extrazytoplasmatischen Abnormalitäten (dunkle Zona Pellucida und erweiterter Perivitelliner Raum), 3. Oozyten mit zytoplasmatischen Abnormalitäten (dunkles Zytoplasma, zytoplasmatische Granulationen, fragmentierter Polkörper), 4. unförmige Eizellen und 5. Oozyten mit mehr als einer Abnormalität.

Schlussfolgerung: Wir favorisierten zur morphologischen Beschreibung ein Einteilungsschema, welches einerseits den Polkörper und andererseits das Zytoplasma beschrieb. Dieses Einteilungsschema erschien uns am übersichtlichsten und konnte problemlos im Invertmikroskop vorgenommen werden. Andere in der Literatur beschriebenen Einteilungsschemata bezogen sich außerdem auf Parameter wie das Vorhandensein von Zelleinschlüssen und Vakuolen, diese Beschreibung erschien uns jedoch zu umfangreich und unüberschaubar. Wir halten zudem den Eizellgesamtdurchmesser für wichtig. Dieser „erste Blick“ auf die Eizelle ist von entscheidender Bedeutung und die Beschreibung wird damit optimiert. Die Einteilung in nur vier Gruppen ist ausreichend, um eine Einfachheit zu gewährleisten.

4.2.2 Korrelation von Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate

Es wurden verschiedene Studien zur Korrelation von Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate durchgeführt. In etwa der Hälfte der Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen Eizellqualität und Befruchtungsrate nach der Spermieninjektion herausgearbeitet werden, die andere Hälfte der Literatur beschrieb keine Korrelation.

Die nachstehende Tabelle (Tabelle 30) liefert einen Überblick der beschriebenen Studien.

Autor, Erscheinungsjahr	Anzahl untersuchter Eizellen	untersuchte Morphologie	Ergebnis
Van Blerkom and Henry, 1992	583	Zytoplasma	Korrelation
Eichenlaub-Ritter, 1995	keine Angabe	erster Polkörper	Korrelation
De Sutter, 1996	528	Zytoplasma	keine Korrelation
Serhal, 1997	837	Zytoplasma	Korrelation
Xia, 1997	903	extrazytoplasmatisch	Korrelation
	903	Zytoplasma	Korrelation
Balaban, 1998	5903	Zytoplasma	keine Korrelation
Loutradis, 1999	keine Angabe	Zytoplasma	Korrelation
Ebner, 1999	keine Angabe	erster Polkörper	Korrelation
Kahraman, 2000	489	Zytoplasma	Korrelation
Ebner, 2000	610	erster Polkörper	keine Korrelation
Mikkelsen, 2001	264	Polkörper	keine Korrelation
Meriano, 2001	274	Zona Pell., Perivitell. Raum	Korrelation
Ciotti, 2004	596	Polkörper	keine Korrelation
Montag, 2006	113	Spindelapparat	Korrelation
Yakin, 2007	616	Zytoplasma	keine Korrelation

Tabelle 30: Übersicht Korrelation Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate (chronologisch)

In Tabelle 30 sind Arbeiten zusammen gestellt, die sich mit der Korrelation von Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate beschäftigt haben.

Positive Korrelation

So beschrieb beispielsweise die Arbeitsgruppe um Loutradis et al. (1999) zwar lediglich das Zytoplasma (reifes Zytoplasma ist definiert als klar aussehend mit einheitlichen Strukturen und fein-homogener Granulation; unreifes Zytoplasma erschien in Form von Vakuolen oder Fragmenten), reife Eizellen konnten jedoch mit einer höheren Schwangerschaftsrate assoziiert werden.

Ebner et al. (1999) untersuchten den Zusammenhang zwischen Morphologie des ersten Polkörpers und Schwangerschafts- bzw. Implantationsrate. Auch hier wird deutlich, dass bei guter Polkörperqualität höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten erzielt werden können.

Eine deutlich schlechtere Befruchtungsrate und Embryoqualität nach ICSI beschrieb Xia (1997). Hier zeigte sich, dass extrazytoplasmatische Anomalien entsprechende Indikatoren für die spätere Fertilisation und Embryoqualität darstellen. Auch Eichenlaub-Ritter et al. (1995) untersuchten den ersten Polkörper und fanden heraus, dass ein degenerierter erster Polkörper verantwortlich ist für eine Asynchronie von Zell- und Zytoplasmareifung. Möglicherweise sind Oozyten mit fragmentierten Polkörpern und erweitertem Perivitellinem Raum zur Zeit der Fertilisation überreif.

Gemäß der Studie von Xia (1997) werden auch in dieser Arbeit Zytoplasmaabnormalitäten mit geminderter Embryoqualität in Zusammenhang gebracht. Van Blerkom and Henry (1992) untersuchten menschliche nach ovarieller Stimulation gewonnene Metaphase II-Oozyten und teilten sie anhand ihrer zytoplasmatischen Auffälligkeiten (lichtmikroskopisch) in sieben Gruppen ein. 1. grobe, dunkle Erscheinung der Eizelle; 2. stark unregelmäßiges und raues Zytoplasma; 3. einzelne zentral im Zytoplasma gelegene dunkle Region; 4. „leerer“ oder organellfreier Bereich im Zytoplasma; 5. Bereiche mit intrazellulärer Nekrose; 6. Akkumulation von SER als elliptischer Körper; 7. Vakuolen. Sie fanden heraus, dass die Hälfte dieser Oozyten aneuploid sind und somit die These belegen, dass es zu einem häufigeren Auftreten von Aneuploidien bei Eizellen mit auffälliger Zytoplasma-Morphologie kommt.

Kahraman et al. (2000) beschrieben geminderte Schwangerschaftsraten bei Eizellen mit zentral granuliertem Zytoplasma trotz normaler Fertilisation und Embryoqualität sowie ein häufigeres Auftreten von Aneuploidien bei Eizellen mit auffälliger Zytoplasma-Morphologie.

Serhal et al. (1997) prüften den Einfluss von Zytoplasma-Morphologie und der Erfolgsrate von ICSI anhand 837 menschlicher Metaphase II-Oozyten. Die am häufigsten zu findenden Zytoplasma-Auffälligkeiten stellen dabei Granulationen und intrazytoplasmatische Einschlüsse dar. Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Studie zeigen, dass der Embryonentransfer aus Eizellen mit zytoplasmatischen Einschlüssen zu keiner Schwangerschaft führte (statistisch signifikantes Ergebnis). Im Ergebnis wurde zwar deutlich, dass die ICSI-Erfolgsrate abhängig ist von der Eizellqualität. Trotzdem kam es zu normaler Fertilisation und Embryoentwicklung nach ICSI von Eizellen mit anormalem Zytoplasma, wie auch schon beschrieben von De Sutter et al. (1996). Die daraus resultierenden Embryonen wiesen jedoch nicht dasselbe Implantationspotential auf wie diejenigen von Eizellen mit normalem Zytoplasma.

Trotzdem sollten diese Eizellen von einer ICSI-Behandlung ausgeschlossen werden, da Eizellen mit auffälliger Zytoplasma-Morphologie ein höheres Aneuploidierisiko haben (Van Blerkom and Henry, 1992).

Montag et al. (2006) untersuchten den Zusammenhang zwischen Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate anhand des Vorhandenseins ihres Spindelapparates. Sie beobachteten den Spindelapparat von menschlichen Metaphase I- und II-Eizellen mit einem neuartigen Abbildungssystem und stellten fest, dass sich der Spindelapparat zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Zelle darstellt. Höhere Schwangerschaftsraten könnten also mit exakterer Terminierung von ICSI erzielt werden.

Schlussfolgerung: Auch wir möchten mit unserer Arbeit einen Beitrag zur Verbesserung der Schwangerschaftsrate nach assistierter Fertilisation beitragen. Ziel ist es, durch möglichst einfache und nicht invasive Methoden „gute“ Eizellen anhand morphologischer Gesichtspunkte zu selektieren. Angaben über eine Korrelation von Eizellbiometrie und Schwangerschaftsrate sind in der Literatur nicht gefunden worden. Wir halten die Erfassung der Biometrie von Eizellen anstatt der Morphologie für sinnvoll, da die Ergebnisse objektiver sind und einheitlicher bewertet werden können.

Negative Korrelation

Andere Studien hingegen widerlegen diese Thesen und sagen aus, dass der ICSI-Erfolg nicht von morphologischen Auffälligkeiten beeinflusst wird.

De Sutter et al. (1996) untersuchten menschliche Metaphase II-Oozyten hinsichtlich ihrer morphologischen Erscheinung im Lichtmikroskop. Am häufigsten wurden dunkle Zytoplasmabereiche, eine dunkle Zona Pellucida, großer Perivitelliner Raum, Vakuolen, refraktile Polkörper und unregelmäßige Eizellform. Diese Abweichungen konnten weder mit der Fertilisationsrate noch mit der Embryoqualität korreliert werden.

Auch Mikkelsen et al. (2001) untersuchten den Zusammenhang von in-vitro-gereiften menschlichen Metaphase II-Oozyten und Fertilisationsrate bzw. Embryoqualität. Die Fertilisationsrate zeigte sich dabei als von der Eizellmorphologie unabhängig. Eizellen ohne Anomalien lieferten jedoch qualitativ höhere Embryonen mit höherer Teilungsrate als solche mit morphologischen Auffälligkeiten. Es konnte ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen Polkörpermorphologie und Embryoqualität, eine Signifikanz bestand jedoch nicht.

Ebner et al. (2000) untersuchten die Morphologie des ersten Polkörpers bei menschlichen Eizellen im Hinblick auf Fertilisationsrate und Embryoqualität nach ICSI. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Anomalien und der Fertilisationsrate. Andererseits zeigt eine Einteilung nach morphologischen Gesichtspunkten des ersten Polkörpers eine signifikante Assoziation sowohl hinsichtlich der Fertilisationsrate ($p < 0.05$), als auch der Embryoqualität ($p < 0.01$). Da kein Zusammenhang besteht zwischen zytoplasmatischen Anomalien und dem Aussehen des ersten Polkörpers, könnte die Polkörpermorphologie prognostische Aussagekraft im Hinblick auf Fertilisationsrate und Embryoqualität besitzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der erste Polkörper trotzdem als prognostischer Faktor oder als geeigneter Indikator für Fertilisationsrate und Embryoqualität von in-vitro-gereiften Metaphase II-Oozyten hinsichtlich Eizellqualität herangezogen werden sollte.

Die Studie von Balaban et al. (1998) zeigt, dass ICSI-Resultate (Fertilisationsrate und Embryoqualität) nicht von der Eizellmorphologie beeinflusst werden. Ciotti et al. (2004) analysierten die Korrelation von Polkörper-Morphologie und Fertilisationsrate, Embryoqualität, Schwangerschafts- und Implantationsrate. Auch in dieser Arbeit konnte keine Beziehung zwischen Polkörper-Morphologie und Fertilisationsrate oder Embryoqualität hergestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Polkörpermorphologie und dem Genotyp konnte nicht hergestellt werden.

Zusammenfassend kann aber unterstrichen werden, dass es sich beim Polkörper um einen „zerbrechlichen“ Parameter handelt, mit dem gefolgert werden kann, dass seine Morphologie einen prognostischen Faktor für Embryoqualität darstellt.

Meriano et al. (2001) untersuchten, ob dysmorphe menschliche Eizellen prognostische Auswirkungen auf das Ergebnis von ICSI haben. Dabei entscheidend waren die Parameter Zona Pellucida (als abnorm definiert wenn dunkel, dick oder dünn) sowie erweiterter Perivitelliner Raum. Zusammenfassend besteht die Annahme, dass Anhäufungen intrazytoplasmatischer Zellorganellen eine negative Vorhersage machen in Bezug auf Schwangerschafts- und Implantationsrate nach ICSI. Auch hier schienen Fertilisation und Embryospaltung nicht negativ affektiert zu sein.

Yakin et al. (2007) verglichen Fertilisationsrate von Eizellen normaler Morphologie mit denen anormaler Morphologie. Eizelldysmorphie wurde klassifiziert als 1. extrazytoplasmatisch mit dunkler Zona Pellucida und großem Perivitellinem Raum, sowie als 2. zytoplasmatisch (dunkles, granuliertes oder vakuolisiertes Zytoplasma und fragmentierte Polkörper; 3. Form-Anomalien; 4. multiple Anomalien. Dabei stellten sich heraus, dass eine auffällige Eizellmorphologie nicht mit geminderter Fertilisationsrate oder ungünstiger Embryoqualität assoziiert sind.

Schlussfolgerung: Im Hinblick auf eine Korrelation von Eizellmorphologie und Aneuploidierate konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang hergestellt werden, da die Ergebnisse statistisch nicht signifikant sind. Wir sind zudem der Meinung, die Gewichtung eher auf die Biometrie von Eizellen statt auf Morphologie zu legen. Unsere Korrelation von Biometrie und Qualität der Eizelle wurde bisher nicht beschrieben.

4.3 Biometrie

a) Polkörper

Zu biometrischen Berechnungen von Polkörpern sind in der Literatur kaum Angaben zu finden. Lediglich morphologische Angaben sind hierzu gemacht worden, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben wurde. Unsere Messungen ergaben eine durchschnittliche Polkörpergröße von $17,03\mu\text{m}$ (Minimum $4,9\mu\text{m}$, Maximum $37,1\mu\text{m}$, Median $14,6\mu\text{m}$). Auch an diesem biometrischen Beispiel wird deutlich, dass die Spanne enorm ist. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf einen unterschiedlichen Reifungsgrad der Eizellen zurück zu führen. Entsprechend schwierig gestaltete sich die Literatursuche. Es wurden keine Angaben zur Biometrie von Polkörpern gemacht.

Verlinsky et al. (2003) untersuchten den ersten Polkörper im Rahmen genotypischer Beschreibung von Eizellen. Analysiert wurden Fertilisationsrate und Embryoqualität, ohne jedoch eine Korrelation aufzuweisen. Auch ein Zusammenhang mit Aneuploidien konnte nicht bestätigt werden.

Auch Gitlin et al. (2003) untersuchten Polkörper. Angaben zur Biometrie fehlen jedoch.

Von unterschiedlichen Reifungsgraden bei Eizellen berichtet die Arbeitsgruppe Montag et al. (2006). Sie untersuchten menschliche Eizellen hinsichtlich des Vorhandenseins ihres Spindelapparates im Zusammenhang mit der Befruchtungsrate. Dabei fanden sie heraus, dass sich der Spindelapparat entgegen der bisherigen Annahme nicht immer in direkter Nachbarschaft zum Polkörper befindet, sondern sich einer gewissen Dynamik unterzieht. Diese Tatsache liefert einen wichtigen Hinweis auf die auch bei Eizellen stattfindende physiologische Entwicklung und Reifung.

Schlussfolgerung: Die Erhebung einheitlicher biometrischer Daten von Polkörpern gestaltete sich sehr schwierig, der Größenbereich der untersuchten Polkörper war erheblich. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der dazu vorhandenen Literatur wieder. Wir halten den Polkörper für einen entscheidenden Parameter bei der biometrischen Beschreibung von Eizellen. Weitere Beschreibungen fehlen in der Literatur.

b) Perivitelliner Raum

Der Perivitelline Raum ist ein Parameter, der bereits bei der ersten Betrachtung der Eizelle auffällt. In unseren Messungen war der kleinste Perivitelline Raum $0,9\mu\text{m}$, der größte $17,7\mu\text{m}$ breit. Im Mittel betrug er $7,00\mu\text{m}$, Medianwert $6,6\mu\text{m}$. Verschiedene Arbeiten wurden gefunden, die sich mit einer Erweiterung des Perivitellinen Raumes befassen, genaue Größenangaben werden darin jedoch nicht gemacht.

So untersuchten beispielsweise Xia et al. (2000) menschliche Eizellen nach dem Status ihres ersten Polkörpers sowie Größe des Perivitellinen Raumes und teilten diese nach den Kriterien „normaler“ und „degenerierter“ Polkörper sowie in „normaler“ und „erweiterter“ Perivitelliner Raum ein.

Auch Talbot et al. (2003) beschrieben die Größe des Perivitellinen Raumes bei Säugetiereizellen als dynamische Größe mit vom Reifungsgrad abhängigen Größenunterschieden.

Wang et al. (1998) untersuchten die Eizellmorphologie bei Schweinen im Zusammenhang mit Polyspermie nach IVF. Beschrieben wurden dabei Zytoplasmadichte, Eizelldurchmesser mit und ohne Zona Pellucida, Zonadicke und Größe des Perivitellinen Raumes.

Schlussfolgerung: Detaillierte Größenangaben von Perivitellinen Räumen existieren in der Literatur nicht. Auch hier variieren unsere Messergebnisse enorm, vergleichbar mit den Ergebnissen zur Polkörpergröße.

c) Zona Pellucida

Die Dicke der Zona Pellucida spielt eine besondere Rolle im Rahmen der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) und stellt einen auffälligen Parameter dar. Sie bildet eine extrazelluläre Schicht, die jede Plasmamembran bei Säugetieren umgibt. Während der Präimplantation wird der heranwachsende Embryo durch sie geschützt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuseeizellen wiesen eine durchschnittliche Zona Pellucida-Dicke von $7,53\mu\text{m}$ auf (kleinster Wert $5,3\mu\text{m}$ und größter $11,6\mu\text{m}$, Median $7,5\mu\text{m}$).

In der Literatur sind verschiedene Arbeiten zu finden, die sich mit der Zona Pellucida von Eizellen beschäftigen. Abhängig von der Säugetierspezies variiert die Zona Pellucida-Dicke zwischen 2 und $20\mu\text{m}$ (Gwatkin, 1977; Wassarman, 1988a; Yanagimachi, 1994). Nur sehr wenige Angaben existieren über die Zonadicke von Mäuseeizellen.

Eine Übersicht sollen die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 31 a und b) liefern:

Autor	Erscheinungs-Jahr	Anzahl untersuchter Eizellen	Spezies	Methode
McGregor	1989	keine Angabe	austral. Nagetiere	Licht- u. Elektronenmikr.
Goyanes	1990	keine Angabe	Mensch	keine Angabe
Boatman	1994	keine Angabe	Hamster	keine Angabe
Bertrand	1995	keine Angabe	Mensch	keine Angabe
Wolf	1995	545	Mensch	keine Angabe
Green	1997	keine Angabe	Maus	keine Angabe
Funahashi	2000	83	Schwein	Elektronenmikrosk.
Strom	2000	104	Hund	Mikroskop
Calado	2001	24	Rind	Lichtmikroskop
Nawroth	2001	843	Mensch	Inverse Mikroskop
Pelletier	2004	keine Angabe	Mensch/reife EZ	digit. Lichtmikroskop
		keine Angabe	Mensch/unreife EZ	digit. Lichtmikroskop
Shiloh	2004	903	Mensch/Raucher	Foto
		keine Angabe	Mensch/Nichtraucher	Foto
Wassarman	2004	keine Angabe	Maus	keine Angabe

Tabelle 31a: Literaturangaben Zona Pellucida

Autor	Erscheinungs-Jahr	Mittelwert in μm	Range in μm	Korrelation
McGregor	1989	7,8 / 11,4	keine Angabe	keine Angabe
Goyanes	1990	17	keine Angabe	keine Angabe
Boatman	1994	keine Angabe	15,0 - 15,8	keine Angabe
Bertrand	1995	17,5	10,0 - 31,0	abhängig v. Fertilisation
Wolf	1995	17,8	keine Angabe	keine Angabe
Green	1997	keine Angabe	5,0 - 10,0	keine Angabe
Funahashi	2000	6,68	keine Angabe	keine Angabe
Strom	2000	keine Angabe	3,0 - 6,0	keine Angabe
Calado	2001	8,5	keine Angabe	keine Angabe
Nawroth	2001	13,07	keine Angabe	Korrel. mit Pat.-Alter
Pelletier	2004	20,4	keine Angabe	abhängig v. Reifegrad
		19,5	keine Angabe	
Shiloh	2004	15,32	keine Angabe	Korrel. mit Rauchverhalten
		20,15	keine Angabe	
Wassarman	2004	6,5	4,3 - 8,1	keine Angabe

Tabelle 31b: Literaturangaben Zona Pellucida

In Tabelle 31 a und b sind diejenigen Arbeiten tabellarisch aufgeführt, welche sich mit der Zona Pellucida-Dicke beschäftigen haben. Bezug genommen wird auf die Anzahl untersuchter Eizellen, die Spezies und den jeweiligen Mittelwert.

So beschrieben Wassarman et al. (2004) die Zona Pellucida der Maus und stellten eine durchschnittliche Dicke von ca. $6,5\mu\text{m}$ ($4,3$ bis $8,1\mu\text{m}$). Green (1997) beschreiben die Zona Pellucida von Säugetieren als auffallend einheitlich mit einer Dicke von $5\text{-}10\mu\text{m}$. Die Maus liefert dafür den größten Datenbestand. McGregor et al. (1989) untersuchten die Zona Pellucida-Struktur australischer Nagetiere. Dabei fand sie bei frisch ovulierten unfixierten Oozyten eine Dicke von $7,8\mu\text{m}$ (*Pseudomys australis*) und $11,4\mu\text{m}$ (*Notomys alexis*).

Deutlich mehr Literatur bezüglich der Zona Pellucida fand sich für andere Säugetierspezies und menschliche Oozyten.

Boatman et al. (1994) untersuchten Hamster-Eizellen. Die Zona Pellucida wies eine Dicke von $15\text{-}15,8\mu\text{m}$ auf. Strom et al. (2000) untersuchten Hundeeizellen hinsichtlich Zona Pellucida-Dicke. Unterschieden wurden in Salz konservierte Oozyten (Zonadicke $0,3\text{-}1,0\mu\text{m}$), Eizellen aus gefrorenen Ovarien ($6\text{-}8\mu\text{m}$) und frische Eizellen ($3\text{-}6\mu\text{m}$). Calado et al. (2001) untersuchten Rindereizellen hinsichtlich Größe und Morphologie. Die Zona Pellucida-Dicke hatte im Mittel eine Dicke von $8,5\mu\text{m}$. Funahashi et al. (2000) untersuchten Schweineeizellen. Die durchschnittliche Zona Pellucida-Dicke wurde mit $6,68\mu\text{m}$ bei ovulierten Oozyten und mit $5,15\mu\text{m}$ bei in vitro gereiften Eizellen angegeben.

Shiloh et al. (2004) untersuchten die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Zona Pellucida-Dicke menschlicher Eizellen. Die Messungen erfolgten an wenigstens sechs verschiedenen Orten der Zona Pellucida. Dabei kam heraus, dass die Zona Pellucida bei Nichtraucherinnen signifikant dünner ist als bei Raucherinnen (aktiv und passiv): durchschnittliche Zonadicke bei Raucherinnen ($20,15 \pm 0,12\mu\text{m}$) und Nichtraucherinnen ($15,32 \pm 0,1\mu\text{m}$). Angaben zur Schwangerschaftsrate wurden in den Untersuchungen von Shiloh et al. nicht gemacht. Einen positiven Zusammenhang zwischen der Zona Pellucida-Dicke und Implantationsrate lieferten jedoch Cohen et al. (1989), wonach eine dünne Zona Pellucida eine Implantation begünstigt. Pelletier et al. (2004) charakterisierten die Architektur menschlicher Eizellen im digitalen Lichtmikroskop. Der Hauptaugenmerk lag dabei auf der Struktur der Zona Pellucida. Die Dicke wurde in acht Quadranten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die unreifen Eizellen eine Zonadicke von $20,4 \pm 2,4\mu\text{m}$ und reife Eizellen eine Dicke von $19,5 \pm 2,2\mu\text{m}$ besitzen. Abhängig von der Patientin bestehen individuelle Unterschiede.

Nawroth et al. (2001) untersuchten ebenfalls menschliche Metaphase II-Eizellen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Zona Pellucida-Dicke und Patientenalter. Die durchschnittliche Zonadicke betrug $13,07 \pm 1,34\mu\text{m}$. Die Zona Pellucida-Dicke korreliert positiv mit dem Patientenalter. Die Korrelation konnte jedoch nicht aufrecht erhalten werden im Hinblick auf den Gesamteizelldurchmesser.

Bertrand et al. (1995) bestimmten die Zona Pellucida-Dicke menschlicher Eizellen. Die Werte variierten von 10 bis $31\mu\text{m}$, im Mittel betrug sie $17,5\mu\text{m}$. Es wurde zusätzlich ein Unterschied herausgearbeitet zwischen fertilisierten und unfertilisierten Oozyten. Dabei stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen heraus. Die Zona Pellucida fertilisierter Eizellen war signifikant dünner ($16,6 \pm 3,2\mu\text{m}$) im Vergleich zu unfertilisierten Eizellen ($18,9 \pm 4,0\mu\text{m}$). Sie wiederholten ein Jahr später (2006) ihre Messungen an menschlichen Eizellen. Unfertilisierte Oozyten $18,9 \pm 3,8\mu\text{m}$ und $16,4 \pm 3,1\mu\text{m}$ für fertilisierte Eizellen. Die Zona Pellucida Dicke wird hier als hauptsächlich individuelles Merkmal angesehen, welches die Fertilisationsrate beeinflusst.

Auch Wolf et al. (1995) untersuchten menschliche Eizellen und maßen eine durchschnittliche Zona Pellucida-Dicke von $17,8 \pm 13,4\mu\text{m}$. Goyanes et al. (1990) bestimmten die Biometrie menschlicher Eizellen im Stadium der Metaphase II. Sie beschrieben die Zona Pellucida mit einer Dicke von $17\mu\text{m}$.

Schlussfolgerung: Der Ergebnisreichtum in der Literatur bezüglich der Zona Pellucida – Biometrie spiegelt auch unsere Gewichtung dieses Parameters wieder. Auch wenn mit der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Korrelationen herausgearbeitet werden konnten, so ist die Zona Pellucida doch eine entscheidende Größe der Eizelle. Sie alleine besitzt jedoch keine Aussagekraft, da innerhalb einer Spezies zu große Unterschiede bestehen. Deshalb sollte die Zona Pellucida als Bestandteil der gesamten Eizelle gesehen und beurteilt werden.

d) Zytoplasmagröße

Hinsichtlich der Zytoplasmagröße ist erstaunlich wenig bekannt. Die Angaben beschränken sich auf die Zytoplasma-Morphologie, welche in Kapitel 4.3.1 beschrieben wurde. Die Eizellen der vorliegenden Arbeit hatten einen mittleren Zytoplasmadurchmesser von $74,13\mu\text{m}$ (minimaler Wert $63,1\mu\text{m}$, Maximum $97\mu\text{m}$, Median $74,1\mu\text{m}$).

e) Gesamtdurchmesser der Eizellen

In der vorliegenden Arbeit besaßen die bewerteten Mäuseeizellen einen mittleren Gesamtdurchmesser von 100,31µm, sowie einen Minimalwert von 79,4µm und einen Maximalwert von 116,3µm (Median 100,3µm). Diese Werte deuten bereits die Schwierigkeit an, einen „optimalen“ Eizelldurchmesser festzulegen. In der Literatur existieren nur wenige Angaben über den Eizellgesamtdurchmesser bei Mäusen. Zusätzlich wurden Angaben über den Eizelldurchmesser von Menschen und anderen Säugetieren gefunden.

Einen Überblick liefert Tabelle 32:

Autor, Erscheinungsjahr	Anzahl untersuchter Eizellen	Spezies	Alter (Tage)	Mittelwert (µm)	Range (µm)
Wassarman/ Josefowicz, 1978	keine Angabe	Maus	< 5 d	keine Angabe	30 - 40
	keine Angabe	Maus	8 - 14 d	keine Angabe	45 - 60
	keine Angabe	Maus	> 15 d	keine Angabe	60 - 80
	keine Angabe	Maus	> 42 d	83	78 - 88
Eppig, 1989	120	Maus	keine Angabe	56	55,7 - 56,3
Boatman, 1994	keine Angabe	Hamster	keine Angabe	79	keine Angabe
Michelmann, 1995	380	Mensch	keine Angabe	167,7	158,2 - 177,2
Wolf, 1995	545	Mensch	keine Angabe	164	144,4 - 183,6
Funahashi, 2000	keine Angabe	Schwein	keine Angabe	72	keine Angabe
Strom, 2000	104	Hund	keine Angabe	79	67 - 91
Calado, 2001	keine Angabe	Rind	keine Angabe	keine Angabe	110 - 120
Balakier, 2002	14.272	Mensch	keine Angabe	154,7	keine Angabe
Ptak, 2006	keine Angabe	Lamm	28 d	keine Angabe	98 - 146
	keine Angabe	Schaf	keine Angabe	keine Angabe	95 - 137
unser Ergebnis	223	Maus	63 - 102	100,3	79,4 - 116,3

Tabelle 32: chronologischer Überblick Gesamtdurchmesser der untersuchten Eizellen

Tabelle 32 gibt einen Überblick über Arbeiten, die sich mit dem Gesamteizelldurchmesser beschäftigt haben. Es bestehen Unterschiede in Anzahl untersuchter Eizellen, Spezies, Alter und Mittelwert.

Schon 1978 untersuchten Wassarman und Josefowicz Mäuseeizellen hinsichtlich ihres Gesamtdurchmessers und lieferten damit die erste detaillierte Analyse isolierter Eizellen in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Eizellen von sehr jungen Tieren (fünf Tage und jünger) zeigten eine Durchmesser von 30-40µm, waren sehr unterschiedlich geformt und zeigten eine sehr dünne Zona Pellucida. Eizellen etwas älterer Mäuse (8 bis 14 Tage) waren überwiegend rund mit prominenter Zona Pellucida. Sie hatten einen Durchmesser von 45-60µm. Beide Altersgruppen waren zu weiterer meiotischer Reifung nicht befähigt.

Der Eizelldurchmesser 15 Tage oder älterer Mäuse betrug zwischen 60 und 80µm. Diese Eizellen waren von einer dichten Zona Pellucida umgeben und ihr Zytoplasma unterschied sich morphologisch deutlich von dem jüngerer Mäuseizellen. Noch ältere Mäuse (älter als 6 Wochen) werden in dieser Arbeit als ausgewachsen definiert und haben einen Durchmesser von $83 \pm 5\mu\text{m}$. In diesen Eizellen nimmt das Zytoplasmavolumen um das fast 80fache der ursprünglichen Menge zu.

Eppig et al. (1989) untersuchten Eizellen, die von 12 Tage alten Mäusen isoliert wurden, um in vitro gereift, fertilisiert und anschließend pseudoschwangeren Mäuseweibchen transferriert zu werden. Während einer zehntägigen Kultivierungszeit erreichten diese Eizellen einen mittleren Gesamtdurchmesser von $56,0 \pm 0,29\mu\text{m}$, welcher demjenigen von 16 Tage alten Mäusen entspricht.

Michelmann et al. (1995) haben fertilisierte und unfertilisierte menschliche Eizellen biometrisch bestimmt. Der mittlere Gesamtdurchmesser betrug $167,7 \pm 9,5\mu\text{m}$ und unterschied sich nicht signifikant in den Gruppen fertilisiert und nicht fertilisiert. Unterschiede traten jedoch in Größe des Perivitellinen Raumes und der Zona Pellucida auf.

Balakier et al. (2002) untersuchten sogenannte Riesen-Eizellen des Menschen. Diese Eizellen treten selten, jedoch in ziemlicher Regelmäßigkeit auf und sind im Gesamtdurchschnitt schätzungsweise 30% größer ($200,4\mu\text{m}$) als normale Eizellen ($154,7\mu\text{m}$). Auch Wolf et al. (1995) untersuchten menschliche Eizellen. Der Gesamteizelldurchmesser betrug $164,0 \pm 19,6\mu\text{m}$.

Ptak et al. (2006) untersuchten Eizellen von vier Wochen alten Zuchtlämmern und ausgewachsenen Schafen. Der Eizellgesamtdurchmesser der Lämmer variierte von 98 bis $146\mu\text{m}$, die Schafseizellen waren 95 bis $137\mu\text{m}$ groß.

Boatman et al. (1994) untersuchten Hamster-Eizellen. Der Gesamtdurchmesser dieser Eizellen betrug $79\mu\text{m}$. Strom et al. (2000) untersuchten Hundeeizellen. Diese wiesen einen mittleren Gesamtdurchmesser von $79 \pm 12\mu\text{m}$ auf. Calado et al. (2001) untersuchten Rindereizellen hinsichtlich Größe und Morphologie. Dazu wurde der Eizellgesamtdurchmesser mit 110 bis $120\mu\text{m}$ bestimmt. Funahashi et al. (2000) untersuchten Schweineizellen. Der mittlere Eizelldurchmesser war dabei bei ovulierten Eizellen größer ($72,0\mu\text{m}$) als bei in vitro gereiften Eizellen ($67,8\mu\text{m}$).

Schlussfolgerung: Unsere Analyse ergab eine deutliche Größenspanne des Eizellgesamtdurchmessers. Diese Tatsache wurde in der Literatur ebenfalls beobachtet und es lässt sich feststellen, dass der Gesamteizelldurchmesser von Eizellen damit als alleiniger Parameter wenig Aussagekraft hat. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass sich die Eizellgröße während ihrer Entwicklung und Reifung stark verändert, kann der „normale“ Durchmesser nur schwer bestimmt werden. Insgesamt kommt es auf die Gesamtheit der Parameter Polkörpergröße, Zona Pellucida-Dicke, Größe von Zytoplasma, Perivitellinem Raum und gesamter Eizelle an.

4.4 Aneuploidien

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aneuploidierate von 24% erfasst. Da in der Literatur bisher keine Aneuploidien von Mäuseeizellen beschrieben wurden, ist ein Vergleich nicht möglich. Es existieren lediglich Angaben zu Untersuchungen von menschlichen Eizellen hinsichtlich Aneuploidien (Tabelle 33).

Autor, Erscheinungsjahr	Spezies	untersuchte Chromosomen	Aneuploidie-Rate
Verlinsky, 1995	Mensch	13, 18, 21, X	23%
Verlinsky, 1996	Mensch	13, 18, 21, X	33%
Verlinsky, 1997/1998/1999	Mensch	13, 18, 21	43%
Munne, 2000	Mensch	13, 16, 18, 21, 22	33,3%
Verlinsky, 2001	Mensch, erster Polkörper	13, 16, 18, 21, 22	36,1%
	Mensch, zweiter Polkörper	13, 16, 18, 21, 22	29%

Tabelle 33: Aneuploidieraten beim Menschen

In dieser Tabelle (Tab. 33) sind Arbeiten dargestellt, die sich mit Eizellen und deren Aneuploidieraten befassen haben. Es sind ausschließlich Arbeiten an menschlichen Eizellen gefunden worden.

In Arbeiten von Verlinsky et al. (1997-1998, 1999) wurde eine durchschnittliche Aneuploidierate von 43% für die Chromosomen 13, 18 und 21 menschlicher Eizellen beschrieben, sowie 23% (Verlinsky et al. 1995) und 33% (Verlinsky et al. 1996) für die Chromosomen 13, 18, 21 und X. 2001 untersuchten Verlinsky et al. Veränderungen der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 und stellten eine Aneuploidierate von 36,1% (erster Polkörper) und 29,3% (zweiter Polkörper) fest. Munne et al. (2000) untersuchten die Aneuploidierate der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 beim Menschen, diese lag bei 33,3%. In unserer Arbeit lag die Aneuploidierate bei 24% und ist somit im vergleichbaren

Rahmen, trotz der Analyse nur eines Chromosoms. Die Aussage hätte sicherlich signifikanter und vergleichbarer werden können, wenn man ein ähnliches Setting wie in der Tabelle 30 dargestellt benutzt hätte.

4.5 Korrelation von Biometrie und Genom

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob das Aussehen von Eizellen prognostische Aussagekraft für die Befruchtungsrate besitzt. Zum größten Teil geht es in dieser Untersuchung um die Morphologie der Oozyten. Angaben zur Eizellqualität im Zusammenhang mit der Biometrie von Eizellen wurden nicht gemacht. Um die Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit zu erhöhen und damit die statistische Aussagekraft zu verbessern, wurden die unterschiedlichen Aneuploidien (Non Disjunction, balancierte und nicht balancierte Prädivision) als „nicht normale“ Genetik zusammengefasst und von der Gruppe der genetisch „normalen“ Eizellen unterschieden.

In der vorliegenden Arbeit konnten für die Parameter Perivitelliner Raum, Zona Pellucida und Zytoplasmagröße keine biometrischen Unterschiede zwischen den Gruppen „genetisch normal“ und „genetisch nicht normal“ gefunden werden. Jedoch unterschieden sich sowohl die genetisch normalen Polkörper von den genetisch nicht normalen, als auch der Eizellgesamtdurchmesser der beiden Gruppen. Eine statistische Signifikanz liegt nicht vor. Aufgrund einer erkennbaren Tendenz wird die Signifikanz der Variablen Polkörper und Eizellgesamtdurchmesser jedoch als schwach signifikant definiert.

Ist ein besonders großer oder kleiner Polkörper mit einer höheren Aneuploidiewahrscheinlichkeit assoziiert?

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biometrie des Polkörpers mit dem Chromosom 16 korreliert. Auffällig dabei war, dass der Polkörper-Durchmesser genetisch „nicht normaler“ Eizellen größer war als derjenige von Eizellen mit einem unauffälligen Chromosom 16. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant ($t = -1,861$, $p < 0,067$). Auch Verlinsky et al. (2003) beschäftigten sich mit dieser Fragestellung. Sie untersuchten den ersten Polkörper menschlicher Eizellen und korrelierten seine Morphologie mit Aneuploidien, konnten jedoch keinen Zusammenhang herstellen. Angaben zu Biometrie von Polkörpern und einer Aneuploidierate existieren nicht.

Sagt der Eizellgesamtdurchmesser etwas über die Aneuploidiewahrscheinlichkeit aus?

Auch der Gesamtdurchmesser der in unserer Arbeit untersuchten Eizellen zeigte Größenunterschiede zwischen den Gruppen „genetisch normal“ und „genetisch nicht normal“. Die genetisch auffälligen Eizellen waren im Durchschnitt kleiner als diejenigen der Gruppe „genetisch normal“. Für diese Variable, wie auch für den Polkörper, sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($t = 1,906$, $p < 0,060$). Vergleichende frühere Arbeiten zu dieser Fragestellung sind nicht existent.

Die übrigen Größen (Perivitelliner Raum, Zona Pellucida und Zytoplasmagröße) genetisch unauffälliger Eizellen unterschieden sich biometrisch nicht von denen genetisch nicht normaler Oozyten. Angaben in der Literatur waren in nur sehr begrenztem Maße zu finden. Lediglich Van Blerkom et al. (1992; Van Blerkom and Henry, 1988; Van Blerkom, 1989b) untersuchten und bestätigten den Zusammenhang zwischen Zytoplasma-Dysmorphien und einer erhöhten Aneuploidierate. Yakin et al. (2007) hingegen konnten kein erhöhtes Aneuploidierisiko mit dysomorphen Eizellen in Verbindung bringen, so wie auch unsere Ergebnisse zeigen.

4.6 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Korrelation zwischen der Biometrie von Mäuseeizellen und ihrem genetischen Status hat ergeben, dass sowohl die Größe des ersten Polkörpers als auch der Eizellgesamtdurchmesser eine Tendenz beschreiben und Rückschlüsse auf genetische Defekte zulassen. Mit Sicherheit ist es ratsam, die beiden beschriebenen Parameter nicht getrennt zu betrachten, sondern als Einheit zu sehen, da sie eine Tendenz beschreiben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Eizellbiometrie einen Selektionsmarker darstellt, wenn auch unsere Untersuchungen um weitere Studien ergänzt werden müssten. Anzustreben ist die Festlegung bestimmter biometrischer Auswahlkriterien, anhand derer diejenigen Eizellen ausgesucht werden können, die anschließend weiterkultiviert und zu einer gesunden Schwangerschaft führen sollen.

5. Literaturverzeichnis

- Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J (1995):** Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote*. 1995 Nov;3(4):283-8.
- Bahceci M, Ulug U (2005):** Does underlying infertility aetiology impact on first trimester miscarriage rate following ICSI? A preliminary report from 1244 singleton gestations. *Hum Reprod*. 2005 Mar;20(3):717-21. Epub 2004 Dec 17.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R (1998):** Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998 Dec;13(12):3431-3.
- Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA (2002):** Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*. 2002 Sep;17(9):2394-401.
- Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y (1995):** Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum Reprod*. 1995 May;10(5):1189-93.
- Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y (1996):** Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness. *Fertil Steril*. 1996 Sep;66(3):408-11.
- Boatman DE, Felson SE, Kimura J (1994):** Changes in morphology, sperm penetration and fertilization of ovulated hamster eggs induced by oviductal exposure. *Hum Reprod*. 1994Mar;9(3):519-26.
- Buckett WM, Chian RC, Dean NL, Sylvestre C, Holzer HE, Tan SL (2007):** Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2007 Sep 26.

Calado AM, Rocha E, Colaco A, Sousa M (2001): Stereologic characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol Reprod.* 2001 Nov;65(5):1383-91.

Calado AM, Rocha E, Colaca A, Sousa M (2003): A stereological study of medium antral follicles during the bovine estrous cycle. *Tissue Cell.* 2003 Oct;35(5):313-23.

Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S (2004): First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod.* 2004 Oct;19(10):2334-9. *Epub* 2004 Sep 3.

Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G (1989): Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril.* 1989 May;51(5):820-7.

Dell'Aquila ME, Caillaud , Maritato F, Martoriati A, Gérard N, Aiudi G, Minoia P, Goudet G (2004): Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004 Jun 22;2:44.

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M (1996): Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996 Mar;11(3):595-7.

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (2005): Unerfüllter Kinderwunsch: Stand der Fortpflanzungsmedizin on Deutschland. „Kinderwunsch in Der Krise“; 28.Juni 2005; S. 2.

Deutsches IVF-Register: Jahresbericht 2006; S.9.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G (1999): Elective transfers of embryos selected on the basis of the first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril.* 1999 Oct;72(4):599-603.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G (2000):

Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Feb;15(2):427-30.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G (2001): A

prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of morphological features and injection technique. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18, 601-606.

Ebner T, Moser M, Sommergruber C, Yaman C, Pfleger U, Tews G (2002): First polar

body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod.* 17:2415-2418.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003): Selection based on morphological

assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update.* 2003 May-Jun;9(3):251-62.

Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D (1995): Recurrent failure in

polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod.* 1995 Sep;10(9):2343-9.

Eppig JJ, Schroeder AC (1989): Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to

undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1989 Aug;41(2):268-76.

Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber A, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J (2006):

Correlation between first polar body morphology and further embryo development. *Acta Biol Hung.* 2006 Sep;57(3):331-8.

Funahashi H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H (2000): Zona reaction in porcine oocytes

fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod.* 2000 Nov;63(5):1437-42.

Gitlin SA, Gibbons WE, Gosden RG (2003): Oocyte biology and genetics relevations from polar bodies. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jun;6(4):403-9.

Gordon JW, Talansky BE (1986): Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool*. 1986 Sep;239(3):347-54.

Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E (1990): Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod*. 1990 Jul;5(5):613-8.

Green DP (1997): Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*. 1997 Sep;2(3):147-56.

Gwatkin RBL (1977): Fertilization Mechanisms in Man and Mammals (Plenum Press, New York 1977)

Haag P, Hanhart N, Müller M (2003/04): *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. 1. Auflage, S.115.

Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM, Hughes MR (1992): Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992 Sep 24;327(13):905-9. Comment in: *N Engl J Med*. 1992 Sep 24;327(13):951-3.

Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2002): Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2002 Mar;77(3):511-5.

John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 1969 Aug 9;223(5206):582-7.

- Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N (2000):** Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2390.
- Kamiguchi Y, Mikamo K (1986):** An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet.* 38(5):724-40.
- Klein SL, Carnovale D, Burnett AL, Wallach EE, Zacur HA, Crone JK, Dawson VL, Nelson RJ, Dawson TM (1998):** Impaired ovulation in mice with targeted deletion of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Mol Med.* 1998 Oct;4(10):658-64.
- Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordström L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T (1995):** Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12446-50.
- Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S (1999):** Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999 Aug;72(2):240-4.
- McGregor L, Flaherty SP, Breed WG (1989):** Structure of the zona pellucida and cumulus oophorus in three species of native Australian rodents. *Gamete Res.* 1989 Jul;23(3):279-87.
- Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF (2001):** Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod.* 2001 Oct;16(10):2118-23
- Michelmann HW, Bogdan A, Hinney B (1995):** Micromorphometry and spermatozoa binding patterns of fertilized and unfertilized human oocytes after in-vitro fertilization *Hum Reprod.* 1995 Dec;10(12):3154-60.

Mikkelsen AL, Lindenberg S (2001): Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Hum Reprod.* 2001 Aug;16(8):1714-8.

Montag M, Schimming T, van der Ven H (2006): Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod Biomed Online.* 2006 Apr;12(4):442-6.

Munné S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernandez E, Fabres C, Mackenna A, Lopez T, Crosby JA, Zegers-Hochschild F (2000): Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenat Diagn.* 2000 Jul;20(7):582-6.

Nawroth F, Müller P, Wolf C, Sudik R (2001): Is the Zona Pellucida thickness of metaphase-II oocytes in an IVF/ICSI program influenced by the patient's age? *Gynecol Obstet Invest.* 2001;52(1):55-9.

Ny A, Leonardsson G, Hägglund AC, Hägglöf P, Ploplis VA, Carmeliet P, Ny T (1999): Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology.* 1999 Nov;140(11):5030-5.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992 Jul 4;340(8810):17-8.

Pardue ML, Gall JG (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 Oct;64(2):600-4.

Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR (2004): Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 2004;81 Suppl 1:850-6.

Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J (2002): Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. *Gynecol Obstet Fertil.* 2002 Oct;30(10):772-9.

Ptak G, Matsukawa K, Palmieri C, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P (2006):

Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes.

Hum Reprod. 2006 Sep;21(9):2228-37. Epub 2006 Jun 21.

Schmutzler AG, Wagner WW, Scholdan J, Kupka MS, Krebs D (1994): 400 cycles with

assisted fertilization in severe teratozoospermia. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1994

Sep;54(9):505-9. German.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM (1997): Oocyte

morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Oocyte Hum*

Reprod. 1997 Jun;12(6):1267-70.

Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganz Z, Dirnfeld

M (2004): The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and

embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod.* 2004 Jan;19(1):157-9.

Stephoe P, Edwards R (1978): Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet.*

1978 Aug 12;2(8085):366.

Ström Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (2000): Sperm

binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes.

J Reprod Fertil. 2000 May;119(1):77-83.

Talansky BE, Gordon JW (1988): Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated

and cultured after zona pellucida drilling. *Gamete Res.* 1988 Nov;21(3):277-87.

Talbot P, Dandekar P (2003): Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy

in mammals? *Microsc Res Tech.* 2003 Jul 1;61(4):349-57.

Tarkowski AK (1966): An air-drying method for chromosome preparations from mouse

eggs. *Cytogenet.* 5:394-400.

Van Blerkom J (1990): Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Tech.* 1990 Dec;16(4):324-46.

Van Blerkom J, Henry G (1992): Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1992 Mar;7(3):379-90.

Veeck L (1991): Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus. *Williams and Williams, Baltimore.*

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J (1995): Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1995 Jul;10(7):1923-7.

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A (1996): Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril.* 1996 Jul;66(1):126-9.

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1997-1998): Pregnancy genetic testing for age-related aneuploidies by polar body analysis. *Genet Test.* 1997-1998;1(4):231-5.

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1999): Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999 Apr;16(4):165-9.

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (2001): Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S47-9.

- Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A (2003):** Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online*. 2003 Oct;7(3):336-41
- Wakayama T, Yanagimachi R (1998):** Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. *Zygote*. 1998 Nov;6(4):341-6.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN (1998):** Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev*. 1998 Mar;49(3):308-16.
- Wassarman PM, Josefowicz WJ (1978):** Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J Morphol*. 1978 May;156(2):209-35.
- Wassarman PM (1988a):** Zona pellucida glycoproteins. *A Rev Biochem* 57:415-442.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES (2004):** Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res*. 2004;105(2-4):228-34. Review
- Wolf JP, Bulwa S, Rodrigues D, Jouannet P (1995):** Human oocyte cytometry and fertilisation rate after subzonal insemination. *Zygote*. 1995 May;3(2):101-9.
- Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, Tan JH (2007):** Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res*. 2007 Aug;17(8):722-31.
- Xia P (1997):** Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997Aug;12(8):1750-5.
- Xia P, Younglai EV (2000):** Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *J Reprod Fertil*. 2000 Mar;118(2):229-33.

Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B (2007): Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo. *Fertil Steril.* 2007 Oct;88(4):811-6.

Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization, in Knobil E, Neill J (eds): The Physiology of Reproduction, vol 1 pp 189-317. *Raven Press, New York 1994.*

6. Abkürzungsverzeichnis

BP	balancierte Prädivision
CCD	Charge coupled device
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIR	Deutsches IVF-Register
DNA	Desoxyribonucleid Acid
ESchG	Embryonenschutzgesetz
EZ	Eizelle
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GF-AD	Gradual Fixation-Air-Drying
HCG	Human Chorionic Gonadotropine
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IU	International Units
IVF	In Vitro Fertilisation
NaCl	Natriumchlorid
NDJ	Non Disjunction
OAT	Oligo-Astheno-Teratozoospermie
PCO	Polycystische Ovarien
PGD	Preimplantation genetic diagnosis
PID	Präimplantationsdiagnostik
PK	Polkörper
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin
PND	Pränataldiagnostik
PVR	Perivitelliner Raum
PZD	Partielle Zona Dissektion
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Standard Saline Citrate
SUZI	Subzonale Spermieninjektion
UBPD	unbalancierte Prädivision
ZP	Zona Pellucida

7. Abbildungsverzeichnis

	Seite
1. Eizelle mit Kumuluskomplex	3
2. Mikroinjektion bei ICSI	4
3. Polkörperbiopsie	7
4. Eizelle mit Polkörper	9
5. Eizelle der Maus	9
6. Entstehung des Polkörpers	10
7. Meiose	11
8. FISH-Mechanismus	14
9. Eizelle Gruppe 1	24
10. Eizelle Gruppe 2	25
11. Eizelle Gruppe 3	26
12. Eizelle Gruppe 4	27
13. Polkörper-Biometrie	28
14. Biometrie von Zona Pellucida, Perivitellinem Raum, Zytoplasma und Eizellgesamtdurchmesser	29
15. Beispiel eines FISH-Bildes	51

8. Tabellenverzeichnis

	Seite
1. Fixierungslösungen und Natriumcitrat	19
2. Fixierungsmethode nach Mikamo und Kamiguchi	30
3. Denaturierungspufferlösung	32
4. SSC	32
5. Waschlösung A	33
6. Waschlösung B	33
7. Eizellselektion	35
8. Versuchsaufbau	37
9. Ergebnisübersicht	38
10. Übersicht Eizellen pro Maus	39
11. Eizellen	42
12. Einfluss von PMSG und HCG auf die Gesamteizellmenge	43
13. Effizienz von Hyaluronidase	44
14. nicht auswertbare Eizell-Präparate (Schritt 1)	46
15. Eizell-Präparate nach biometrischer Bestimmung und anschließender FISH (Schritt 2)	47
16. Verteilung genetisch „normaler“ und genetisch „nicht normaler“ Mäuseeizellen	49
17. FISH-Ergebnisse im Überblick	51
18. Einteilung der Eizellen in 4 morphologische Gruppen	53
19. Verteilung der morphologischen Gruppen nach Häufigkeit	56
20. Übersicht über die Verteilung von Eizellen mit und ohne Polkörper	57
21. Anzahl morphologischer Gruppen mit biometrischer Bestimmung pro Versuch	58
22. Normalparameter	68

23.	Verteilung der biometrisch „normalen“ Eizellen	69
24.	Beschreibende Statistik (Genetik normal vs. nicht normal)	70
25.	Korrelation „normale“ Biometrie und Genom	71
26.	Korrelation „nicht normale“ Biometrie und Genom	72
27.	Korrelation von normaler Biometrie und normalem Chromosom 16	72
28.	Stimulierungsmethoden	74
29.	Morphologische Einteilung (chronologisch)	77
30.	Übersicht Korrelation Eizellmorphologie und Schwangerschaftsrate (chronologisch)	80
31 a und b.	Literaturangaben Zona Pellucida	87
32.	chronologischer Überblick Gesamtdurchmesser der untersuchten Eizellen	90
33.	Aneuploidieraten beim Menschen	92

9. Diagrammverzeichnis

	Seite
1. Eizellmenge und Alter der Maus	40
2. Altersverteilung	41
3. Verteilung der Eizellen	42
4. Übersicht Chromosomenausbreitung	45
5. Übersicht über die Wirksamkeit der FISH-Analyse	47
6. Resultat der FISH-Analyse	50
7. Verteilung der morphologischen Eizellgruppen (Zytoplasma 1-4)	54
8. Prozentuale Verteilung der morphologischen Eizellgruppen (Zytoplasma 1-4)	54
9. Verteilung der morphologischen Eizellgruppen (Polkörper 1-4)	55
10. Prozentuale Verteilung der morphologischen Eizellgruppen (Polkörper 1-4)	55
11. Darstellung des kleinsten, größten und des Durchschnitts- Polkörpers	59
12. Verteilung der Polkörper-Größen auf die verschiedenen morphologischen Gruppen	59
13. kleinster, größter und durchschnittlicher Perivitelliner Raum	60
14. Verteilung durchschnittlicher Perivitelliner Raum auf morphologische Gruppen	61
15. schmalste, dickste und durchschnittliche Zona Pellucida	62
16. Verteilung durchschnittliche Zona Pellucida-Dicke auf morphologische Gruppen	63
17. kleinster, größter und durchschnittlicher Zytoplasma- Durchmesser	64
18. Verteilung durchschnittlicher Zytoplasmadurchmesser auf morphologische Gruppen	65
19. kleinster, größter und durchschnittlicher Eizelldurchmesser	66

- 20.** Verteilung durchschnittlicher Eizell-Gesamtdurchmesser
auf morphologische Gruppen

67

10. Zusammenfassung

Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Korrelation von Biometrie und Genom bei Mäuseeizellen besteht. Dadurch soll versucht werden, die Schwangerschaftsrate im Rahmen assistierter Fertilisation durch optische Beurteilung der Eizellen und Vorauswahl anhand morphologischer und biometrischer Kriterien, also nicht invasiver Maßnahmen, zu erhöhen. Die Untersuchungen erfolgten an Mäuseeizellen und sollen eine mögliche Übertragbarkeit auf menschliche Eizellen herstellen mit Wahrung des Embryonenschutzgesetzes (ESchG).

Material und Methoden

Dazu wurden Mäuseeizellen zu vier morphologischen Gruppen anhand der Parameter Polkörper und Zytoplasma zusammengefasst. Außerdem bestimmten wir ihre Biometrie mit Hilfe der Parameter Polkörperdurchmesser, Größe des Perivitellinen Raumes, Dicke der Zona Pellucida, Zytoplasma- und Eizellgesamtdurchmesser. Anhand dieser Angaben konnte die „normale Eizelle“ (Oogramm) definiert werden.

Anschließend wurde mittels FISH-Analyse das Chromosom 16 auf Aneuploidien untersucht. Das Chromosom 16 der Maus entspricht in weiten Strecken dem menschlichen Chromosom 21 und stellt somit eine sehr häufige Chromosomenabberation dar. Es wurden folgende Aneuploidien berücksichtigt: Non-Disjunction zweier homologer Chromosomen sowie unbalancierte und balancierte Prädivision von Schwesterchromatiden.

Ergebnisse

Erstellt werden konnte ein Oogramm, welches morphologisch „normale“ Eizellen beschreibt. Hauptaugenmerk lag dabei auf den Parametern Polkörper, Perivitelliner Raum, Zona Pellucida, Zytoplasma und Eizellgesamtdurchmesser. Die „Normalwerte“ sind definitionsgemäß jeweils eine Standardabweichung ober- und unterhalb des Mittelwertes. „Normale“ Eizellen des untersuchten Mäustammes haben somit einen Gesamtdurchmesser im Bereich von 95,87µm bis 104,75µm, ihr Polkörper misst zwischen 9,58µm und 24,48µm.

Die Zona Pellucida „normaler“ Eizellen soll zwischen 6,72µm und 8,34µm dick und der Perivitelline Raum 4,53µm bis 9,47µm breit sein. Der Zytoplasmadurchmesser „normaler“ Eizellen beträgt 71,23µm bis 77,03µm.

Die Erstellung eines Oogramms erfolgte in Anlehnung an das Spermogramm.

26,5% (59 Eizellen) der von uns untersuchten Eizellen wiesen in allen biometrischen Parametern Normwerte auf. Jeweils einen „normal“ großen Polkörper hatten 130 Eizellen (58,3%), einen normwertigen Perivitellinen Raum 158 Eizellen (70,9%), eine „normale“ Zona Pellucida 165 Eizellen (74%) sowie ein „normales“ Zytoplasma 172 (77,1%) unserer untersuchten Eizellen.

60 der analysierbaren Eizellpräparate (76%) wiesen ein normales Chromosom 16 auf. Eine Non-Disjunction + fand sich in 2,5% der Fälle (2 Eizellen), eine balancierte Prädivision 8 mal (10,1%), unbalancierte Prädivisionen + 7 mal (8,9%) sowie unbalancierte Prädivisionen – in 2,5% der analysierbaren Präparate (2 Mal). Non Disjunction – fanden wir in unseren Untersuchungen nicht.

Es wurde zunächst ein Zusammenhang hergestellt zwischen der Biometrie und ihrem Genom („normales“ vs. „nicht normales“ Chromosom 16). Eine nur schwache Signifikanz konnte bei den Parametern „Polkörper“ ($p=0,067$ bei einem Signifikanzniveau von 5%) und Eizellgesamtdurchmesser ($p=0,06$) aufgezeigt werden, eine Korrelation der übrigen Parameter war nicht signifikant.

Daraufhin untersuchten wir die Korrelation von „normaler“ und „nicht normaler“ Biometrie und Genom („normales“ vs. „nicht normales“ Chromosom 16), auch hier konnte ein schwach signifikanter Zusammenhang zwischen biometrisch „normalen“ Eizellen und der Wahrscheinlichkeit eines ebenso „normalen“ Chromosom 16 (Korrelation = 0,194 und Signifikanz $p = 0,055$) nachgewiesen werden.

Diskussion

Insgesamt gestaltete sich die Suche nach einheitlichen Angaben zur Biometrie von Eizellen schwierig, da die Größenbereiche erheblich variierten. Bezüglich der Parameter Perivitelliner Raum und Zytoplasma waren überhaupt keine Angaben zu finden.

Hinweise auf eine Korrelation von Biometrie und Genom wurden in der Literatur nicht gemacht, die Angaben beschränken sich auf die Morphologie der Eizellen. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen biometrische Unterschiede zwischen genetisch normalen Polkörpern von genetisch nicht normalen, sowie der Eizellgesamtdurchmesser beider Gruppen.

Schlussfolgerung

Mit dem Versuch, eine Korrelation zwischen der Biometrie von Mäuseeizellen und ihrem genetischen Status heraus zu arbeiten, konnte gezeigt werden, dass sowohl die Größe des ersten Polkörpers als auch des Eizellgesamtdurchmessers lediglich eine Tendenz beschreiben und Rückschlüsse auf genetische Defekte zulassen. Perspektivisch müssten unsere Untersuchungen um weitere Studien ergänzt werden, um einerseits die Fallzahl zu steigern und um andererseits biometrische Auswahlkriterien fest zu legen, die ein bestimmtes Beurteilungsverfahren von Eizellen standardisieren.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Katrin Petersen
Anschrift:	Spanische Allee 38, 14129 Berlin
Geburtsdatum:	3.7.1975
Geburtsort:	Lüneburg
Familienstand:	zusammenlebend
Kinder:	Sohn Oskar (* 15.11.2006) Tochter Marlene (* 22.10.2008)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule Embsen
1986 – 1988	Orientierungsstufe Embsen
1988 – 1995	Gymnasium Wilhelm-Raabe, Lüneburg Abitur

Studium

10 / 1997 – 04 / 2003	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04 / 2003 – 06 / 2004	Studium der Humanmedizin an der Humboldt- Universität zu Berlin Drittes Staatsexamen

Praktische Tätigkeiten

10 / 1999 – 03 / 2003	Koordinatorin im Transplantationszentrum der Universität Kiel
05 / 2002 – 03 / 2003	Perfusionistin im Explantationsteam der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Kiel
Mai 2005 – 10 / 2006	Weiterbildung Innere Medizin am Städtischen Klinikum St. Georg Leipzig 2. Medizinische Klinik, Prof. Dr. B. Ruf
02 / 2008 – 01 / 2009	Weiterbildung Anästhesie und Intensivmedizin DRK Kliniken Berlin Westend, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin

Promotion

seit 10 / 2001	Promotion an der Frauenklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Frau Prof. Dr. L. Mettler / Herr Prof. N. Arnold / Herr Dr. A. G. Schmutzler) Thema: <i>Korrelation von Eizellbiometrie und Genom bei Mäusen</i>
----------------	--

Berlin, den 11.1.2010

12. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie des Kinderwunschzentrums bedanken:

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Norbert Arnold und Frau Prof. Dr. Mettler** für Möglichkeit, die Arbeit in der Frauenklinik durchführen zu können.

Ich bedanke mich bei **Herrn Dr. med. Andreas G. Schmutzler** für die Bereitstellung des Themas sowie für die intensive Betreuung und Gestaltung der Arbeit.

Dr. Jörg Weimer für seine Hilfe bei der zytogenetischen Auswertung der Eizellpräparate und Hilfestellung bei der Beantwortung genetischer Fragen, sowie für die freundliche Bereitstellung von Bildmaterial.

Wen Chen für die Betreuung bei der Eizellhybridisierung.

Frau Buck und Frau Fünkner aus dem IVF-Labor für ihre technische Assistenz und die Überlassung der technischen Geräte.

Frau Grams für die Unterstützung bei der Hybridisierung.

Herr Dr. Sievers für die statistische Auswertung meiner Daten sowie für seine Geduld bei der Beantwortung vieler Fragen.

Sabine Reusch für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, an den Mikroskopen und Computern.

Sina Baur für die tatkräftige Unterstützung bei der graphischen Gestaltung.

Herrn Dr. A. Salmassi für die freundliche Überlassung von Bildmaterial.

Last but not least danke ich **meinen lieben Eltern** für die unermüdliche Unterstützung meiner medizinischen Ausbildung, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre.